

**SECUENCIACIÓN DE SIGUIENTE GENERACIÓN EN
MUJERES AFECTADAS POR FALLA OVÁRICA PREMATURA
NO SINDRÓMICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS
GENES ETIÓLOGICOS DE LA ENFERMEDAD Y ESTUDIO
FUNCIONAL DE LA MUTACIÓN p.Thr943Ile EN ADAMTS19**

ASID DE JESUS RODRIGUEZ VILLANUEVA

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA
DEL ROSARIO**

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, D.C. FEBRERO DE 2016

**SECUENCIACIÓN DE SIGUIENTE GENERACIÓN EN
MUJERES AFECTADAS POR FALLA OVÁRICA PREMATURA
NO SINDRÓMICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS
GENES ETIÓLOGICOS DE LA ENFERMEDAD Y ESTUDIO
FUNCIONAL DE LA MUTACIÓN p.Thr943Ile EN ADAMTS19**

ASID DE JESUS RODRIGUEZ VILLANUEVA

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito parcial para optar al título de
MAGISTER EN GENÉTICA HUMANA**

DIRECTOR

PAUL LAISSUE MD, MSc, PhD. HDR

CO-DIRECTOR

DORA FONSECA MSc, PhD (c)

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA
DEL ROSARIO**

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, D.C. FEBRERO DE 2016

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que las tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Nota de Aceptación

Director

Co-Director

Jurado

Jurado

Bogotá D. C. Febrero de 2016

Agradecimientos

A Dios por hacer de mi camino de vida el indicado.

A mis padres, por ser la base de mi formación como ser humano y por su ayuda constante ante cualquier circunstancia.

A mis hermanos, por ser mi compañía en la vida y llenarme de cariño.

Al Dr. Paul Laissue y la Dra. Dora Fonseca por entregarme su experiencia y conocimiento para crecer intelectualmente durante la elaboración de esta tesis

A mis compañeros de maestría, por ayudarme en la búsqueda de la excelencia.

A la Universidad del Rosario por la oportunidad de desarrollar el trabajo de investigación.

.

1 Contenido

2	Resumen	1
3	Introducción.....	2
4	Marco Teórico.....	3
4.1	Falla Ovárica Prematura.....	3
4.1.1	Definición.....	3
4.1.2	Epidemiología.....	3
4.1.3	Etiología	4
4.2	Técnicas de secuenciación del ADN.....	17
4.2.1	Secuenciación de siguiente generación	19
4.3	Metaloproteinasas ADAM/ADAMTS	24
4.3.1	Dominios estructurales.....	24
4.3.2	Regulación de ADAMs	26
4.3.3	Funciones biológicas de ADAMs	27
4.3.4	Regulación de ADAMTS	29
4.3.5	Funciones biológicas de ADAMTS.....	30
4.3.6	Proteínas ADAMTSL.....	31
4.3.7	ADAMTS en relación con la fertilidad	31
4.4	ADAMTS19	33
4.5	COL6A2.....	37
5	Preguntas Científicas.....	39
6	Objetivos de la Investigación	39
6.1	Objetivo general.....	39
6.2	Objetivos específicos	39
7	Materiales y Métodos.....	40
7.1	Secuenciación de siguiente generación.....	40
7.1.1	Población de Estudio	40
7.1.2	Extracción del ADN	40
7.1.3	NGS.....	41
7.1.4	Diseño de Primers.....	43
7.1.5	Amplificación del ADN.....	43
7.1.6	Análisis <i>in silico</i>	44
7.2	Estudio de la interacción proteína-proteína	45
7.2.1	Sistema de doble híbrido en levaduras.....	45
7.2.2	Sistema de doble híbrido en células eucariotas - CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System	47
8	Resultados	64
8.1	NGS.....	64

8.2	Fenotipo de la paciente	65
8.3	Predicciones <i>in silico</i>	65
8.4	Frecuencia alélica	66
8.5	Sistema de Doble híbrido en levaduras	66
8.6	Sistema de doble híbrido en células eucariotas - CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System.....	67
9	Discusión	68
10	Perspectivas	72
11	Anexos	73
11.1	Anexo 1.....	73
11.2	Anexo 2.....	74
11.3	Anexo 3.....	77
11.4	Anexo 4.....	78
12	Bibliografía	90

Figuras

Figura 1. Dominios estructurales de proteínas ADAMTS/ADAM	25
Figura 2. Modelo 'triple-membrane-passing-signalling'. Tomada y modificada de Wetzker & Böhmer, 2003.	28
Figura 3. Dominios estructurales proteína ADAMTS-19.	35
Figura 4. Principio del tamizaje de doble híbrido ULTimate Y2H (Hybrigenics). Bait: Proteína de interés, Prey: Proteínas de interacción - librería.....	46
Figura 5. Representación esquemática del sistema CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System.....	48
Figura 6. Mapa del vector pACT	49
Figura 7. Mapa del Vector pBIND	50
Figura 8. Mapa del vector pG5luc.....	50
Figura 9. Esquema de mutagénesis dirigida, tomada y modificada de (PATEL et al. 2009).....	55
Figura 10. Cromatograma de secuenciación de Sanger de la paciente POF-7	64
Figura 11. Resultados CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System.....	67

Tablas

Tabla 1. Primers de amplificación de ADAMTS19	43
Tabla 2. Primers de secuenciación de ADAMTS19	43
Tabla 3. Programa del termociclador para la PCR para la amplificación del exón 19 del gen ADAMTS19	44
Tabla 4. Categorías de interacción entre proteínas - Global PBS.	47
Tabla 5. Primers de amplificación para ADAMTS19	51
Tabla 6. Condiciones de la reacción de ligación	53
Tabla 7. Primers para mutagénesis dirigida.....	56
Tabla 8. Programa del termociclador para la PCR para la amplificación del fragmento A del gen ADAMTS19.....	56
Tabla 9. Programa del termociclador para la PCR para la amplificación del fragmento B del gen ADAMTS19.....	56
Tabla 10. Programa del termociclador para la segunda ronda de PCR.....	57
Tabla 11. Clonaje en pCR-XL-TOPO.....	59
Tabla 12. Primers de amplificación para COL6A2	61
Tabla 13. Co-transfecciones realizadas.....	62
Tabla 14. Variantes encontradas en la NGS.....	64
Tabla 15. Resumen de características clínicas y moleculares.	65
Tabla 16. Resultados global PBS ULTImate Y2H SCREEN Mus musculus - Adamts19 vs Mouse Ovaries_RP1	66

Anexos

Anexo 1: Secuenciadores automáticos.

Anexo2: Genes Incluidos en el microarreglo de secuenciación

Anexo 3: Resultados de ULTimate Y2H

Anexo 4: Artículo: Next generation sequencing in women affected by nonsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations. Dora Janeth Fonseca, Ph.D., Liliana Catherine Patiño, M.Sc., Yohjana Carolina Suárez, M.Sc., Asid de Jesús Rodríguez, M.Sc., Heidi Eliana Mateus, M.D., M.Sc., Karen Marcela Jiménez, M.Sc., Oscar Ortega-Recalde, M.D., M.Sc., Ivonne Díaz-Yamal, M.D., and Paul Laissue, M.D., Ph.D.

2 Resumen

La infertilidad afecta en la actualidad a aproximadamente 1 de cada 7 parejas a nivel mundial. La falla ovárica prematura (FOP) es una condición común en la población femenina, afectando al 1% de mujeres menores de 40 años. La etiología de la FOP es idiopática entre el 50% y el 80% de los casos, lo que sugiere causas genéticas, epigenéticas y ambientales aún desconocidas. A pesar de los avances en las técnicas de cartografía genética y de sistematización de la técnica de Sanger, pocos genes etiológicos de FOP fueron identificados en los últimos 20 años. Este fracaso relativo se asoció principalmente a que cientos de genes, que abarcan grandes regiones del genoma, son candidatos pero la técnica de secuenciación directa sólo permite el análisis de unas 700bp en cada reacción.

En el presente trabajo se empleó la secuenciación de siguiente generación (NGS) para la búsqueda de mutaciones en 70 genes candidatos que potencialmente contribuyen con el desarrollo de la patología. Se identificaron mutaciones en 3 de 12 pacientes. La paciente POF-7 presentaba una mutación no sinónima en el gen *ADAMTS19* (c.2828C>T, p.Thr943Ile). La proteína ADAMTS19 se clasifica dentro de la familia ADAMTS como huérfana ya que no se ha identificado su sustrato. Mediante el sistema de doble híbrido en levaduras se buscó identificar las potenciales proteínas que interactúan con ADAMTS19. Permitió identificar, a partir de las versiones murinas, la interacción de Adamts19 y Col6a2. Para comprobar la interacción entre las proteínas ADAMTS19 y COL6A2 humanas se empleó el sistema de doble híbrido en células eucariotas. Los hallazgos no permitieron replicar los resultados obtenidos previamente. En síntesis se identificó una mutación potencialmente causal de FOP en un gen nuevo y una muy probable interacción entre ADAMTS19 y COL6A2.

3 Introducción general

El aumento sustancial de la incidencia de la infertilidad humana ha convertido esta patología en un problema real de salud pública, 1 de cada 6 parejas consultan por esta causa. Entre las causas femeninas de infertilidad la FOP es una de las principales patologías afectando entre el 1% y 2% de las mujeres menores de 40 años. Se han descrito diversas etiologías de la FOP (autoinmunes, infecciosas, iatrogénicas) pero entre 50% - 80% de los casos la etiología de la FOP es idiopática, lo que sugiere causas genéticas, epigenéticas y ambientales aún desconocidas. Por medio de técnicas tradicionales de secuenciación se ha buscado identificar variantes de secuencias en las regiones codificantes de los genes candidatos de FOP. Sin embargo, menos de 50 mutaciones han sido validados en sólo nueve genes. La secuenciación de siguiente generación (NGS) ha sido ampliamente utilizada como una alternativa eficaz para la detección de nuevos genes relacionados con la enfermedad monogénicas. Recientemente se ha utilizado para estudiar las regiones codificantes de múltiples genes que participan en la fisiopatología de las enfermedades poligénicas. El presente estudio permitió por primera vez la realización de ensayos de NGS en mujeres afectadas por la FOP no sindrómica.

4 Marco Teórico

4.1 Falla Ovárica Prematura

4.1.1 Definición

La falla ovárica prematura (FOP) es una patología caracterizada por amenorrea de 4 a 6 meses de evolución asociada a hipoestrogenismo, niveles elevados de gonadotropinas e infertilidad en mujeres menores de 40 años de edad (KALANTARIDOU *et al.* 1998). Esta patología puede presentarse tanto con amenorrea primaria como secundaria (DAVIS 1996). Los niveles de FSH deben encontrarse por encima de 40 mUI/ml. Los niveles de estradiol están típicamente disminuidos, menores a 50 pg/ml (medidos en dos ocasiones en meses distintos) (KALANTARIDOU *et al.* 1998; REBAR 2009; SHELLING 2010). La edad para la presentación del último período menstrual se ha establecido en promedio en 50 años, teniendo un intervalo de aparición entre los 45 – 55 años. Se ha establecido edades menores de 40 años para definir la FOP (McKINLAY *et al.* 1992; CONWAY 2000).

4.1.2 Epidemiología

La FOP es una condición común en la población femenina, afectando al 1% de mujeres menores de 40 años y al 0.1% de mujeres menores de 30 años (COULAM *et al.* 1986).

En mujeres con amenorrea primaria la prevalencia de FOP es del 10% al 28%, y en mujeres con amenorrea secundaria es del 4% al 18% (ANASTI 1998). Estos datos muestran que no es una patología infrecuente considerando que muchas mujeres podrían no consultar al considerar que la falta de períodos menstruales no es un problema médico relevante. Sin embargo, la función ovárica intermitente ha sido reportada en algunas pacientes y el embarazo puede ocurrir, aproximadamente, en el 5% al 10% de las pacientes diagnosticadas con FOP (KREINER *et al.* 1988).

Además en un 10% al 15% de las pacientes con FOP puede determinarse una causa genética (BACHELOT *et al.* 2009).

4.1.3 Etiología

Durante el desarrollo ovárico en el período de la embriogénesis están presentes alrededor de 7 millones de folículos primarios. En su mayoría se perderán por un proceso de atresia durante la vida fetal y postnatal y solo aproximadamente unos 500 podrán ser ovulados de manera fisiológica durante la vida de la mujer (GOUGEON 1996). Los probables mecanismos que dan origen a la FOP son a) un descenso inicial en el pool de folículos primordiales; b) un proceso acelerado de atresia folicular; c) una alteración en la maduración y en el reclutamiento de los folículos primordiales (PERSANI *et al.* 2010). Diversas etiologías se han identificado como causales de FOP, entre las que se encuentran factores autoinmunes, iatrogénicos, infecciosos, metabólicos y genéticos (KALANTARIDOU *et al.* 1998; CONWAY 2000; VUJOVIC 2009). En la mayoría de los casos (entre 50% - 80%) la etiología de la FOP es idiopática, lo que sugiere causas genéticas, epigenéticas y ambientales aún desconocidas (KALANTARIDOU *et al.* 1998; PERSANI *et al.* 2010).

4.1.3.1 Causas no-genéticas

Algunos casos de FOP pueden ser debidos a un auto-reconocimiento anormal del ovario por el sistema inmune. Estudios previos han determinado que enfermedades autoinmunes representan hasta un 30% de las causas de FOP (CONWAY 1996). Alteraciones en las células T probablemente desempeñan un papel importante en la patogénesis de la FOP autoinmune. Además, se ha encontrado un aumento de los anticuerpos producidos por células B, una reducción del número de células asesinas naturales (NK) y una alteración de la actividad de las células NK. Igualmente, se ha identificado una función relevante de las citoquinas en la causa de la atresia folicular en la FOP (PEKONEN *et al.* 1986).

Hasta un 40% de las mujeres con FOP presentan auto-anticuerpos positivos, siendo el más común el anti-tiroideo (BELVISI *et al.* 1993). La FOP puede ser

asociada a patologías autoinmunes endocrinas como la enfermedad tiroidea, la diabetes mellitus o la enfermedad de Addison. Así mismo, se ha relacionado con patologías no-endocrinas como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide o el síndrome Sjogren, entre otras (VUJOVIC 2009).

Entre las causas autoinmunes debemos destacar que la asociación con autoinmunidad adrenal (enfermedad de Addison) representa entre el 2% y el 10% de los casos de FOP. Los auto-antígenos compartidos entre las glándulas suprarrenales y los ovarios, en particular para las enzimas de escisión de la cadena lateral del anillo esteroideo, podrían explicar la asociación entre la insuficiencia ovárica y la enfermedad de Addison. Una respuesta autoinmune a estas enzimas esteroideogénicas y las células esteroideas ováricas parece mediar la privación de la función ovárica en estos casos (BAKALOV *et al.* 2005; GOSWAMI and CONWAY 2005). Igualmente, se ha podido establecer a través de diversos estudios la presencia de anticuerpos específicos del ovario que podrían estar involucrados en la patogénesis de la FOP (LUBORSKY *et al.* 1990; WHEATCROFT *et al.* 1997). Existen diferentes posibles dianas antigénicas para el daño mediado por anticuerpos en la FOP. Estas pueden ser la producción de anticuerpos contra los receptores de gonadotropinas y las células productoras de esteroides, entre otras (ANASTI 1998; GOSWAMI and CONWAY 2005).

En pacientes que han desarrollado enfermedades malignas, unas causas conocidas que pueden desencadenar FOP, son la radioterapia y la quimioterapia (HOWELL and SHALET 1998). Sin embargo, estudios previos han determinado que el riesgo de FOP es bajo cuando no se han realizado estas terapias sobre la zona pélvica (MADSEN *et al.* 1995).

Los efectos de la radioterapia sobre el cuerpo femenino también dependerán de la edad de la paciente al momento de someterse a este tratamiento y de la dosis del mismo. Los ovarios prepuberales, tienen una mejor resistencia a la toxicidad asociada al tratamiento (BEERENDONK and BRAAT 2005). De igual manera los agentes quimioterapéuticos afectan la estructura y la función de las células de la

granulosa y de los ovocitos (GOSWAMI and CONWAY 2005). La ovariopexia, una técnica que permite excluir del campo de radiación a los ovarios, previo al inicio de las radioterapias, ha mostrado preservar la función ovárica en las pacientes sometidas a este tipo de tratamientos(VUJOVIC 2009).

Además, casi cualquier cirugía pélvica tiene el potencial de provocar un daño ovárico y desencadenar FOP, al afectar el suministro de sangre o causar inflamación y adherencias fibrosas en la zona. El riesgo exacto es desconocido y se cree que es muy bajo para cirugías de rutina. La embolización de la arteria uterina, una técnica intervencionista utilizada para tratar diversos trastornos ginecológicos, potencialmente también podría desencadenar FOP al comprometer el aporte vascular del ovario (AMATO and ROBERTS 2001). La ooforitis secundaria a parotiditis se ha asociado a FOP en un 2% al 8% de las pacientes. Así mismo, otras causas infecciosas asociadas a FOP incluyen la tuberculosis, la malaria, la varicela, la shigella, el citomegalovirus y el herpes simplex (VUJOVIC 2009). El cigarrillo también se ha encontrado asociado a esta enfermedad. Las mujeres fumadoras experimentan una menopausia más temprana que las no fumadoras, sugiriendo un posible efecto adverso del cigarrillo sobre la función ovárica (DI PROSPERO *et al.* 2004). Se ha encontrado que algunos compuestos químicos pueden modificar la función ovárica al alterar la proliferación celular o al llevar a muerte celular. Se han implicado en estos procesos los químicos industriales, los plásticos, los pesticidas, los solventes y los metales pesados (SHARARA *et al.* 1998).

4.1.3.2 Causas genéticas

Múltiples observaciones soportan la función que cumplen los mecanismos genéticos en la patogénesis de la FOP. Por ejemplo, los defectos ováricos presentes en pacientes con Síndrome de Turner y otras anormalidades cromosómicas relacionadas con el cromosoma X (deleciones y translocaciones), indican el rol esencial que tienen los genes localizados en estas regiones en la función ovárica. La patogénesis de la FOP se ha relacionado con deleciones y

rearreglos que involucran los loci *FOP-1*, *FOP-2* y *FOP-3* localizados en el cromosoma X (LAISSUE *et al.* 2008). Mujeres con deleciones en Xp11.1 a Xp21 muestran un fenotipo completo de FOP (THERMAN *et al.* 1990). Los puntos de rupturas cromosómicos más frecuentes involucran el loci *FOP-1* (Xq26-qter) y *FOP-2* (Xq13.3-q21.1) (THARAPEL *et al.* 1993; POWELL *et al.* 1994). Las deleciones distales que involucran a *FOP-1* están asociadas frecuentemente con FOP de aparición entre los 24 a 39 años. Los genes localizados en esta región son *FMR1*, *FMR2*, *HS6ST*, *E2F* y *GPC3* y el elemento LINE 1 (DAVISON *et al.* 2000). Translocaciones que involucran *FOP-2* causan FOP de aparición más temprana, entre los 16 a 21 años. En esta región se ha identificado el gen *DIAPH2* (KRAUSS *et al.* 1987; BIONE *et al.* 1998; VUJOVIC 2009). La región *FOP-3* (Xp11.1-p22.1) se encuentra relacionada mayoritariamente con FOP de inicio temprano y con otras características asociadas al Síndrome de Turner. En esta región se encuentran diversos genes requeridos para la correcta función ovárica (e.g. *USP9X*, *BMP15*, *UBE1*) (ZINN and ROSS 1998; ZINN *et al.* 1998).

Además, mutaciones en genes localizados en los autosomas también han sido asociadas a la FOP sindrómica y no sindrómica (LAISSUE *et al.* 2008; PERSANI *et al.* 2010; LAISSUE 2015).

4.1.3.2.1 Formas Sindrómicas

Entre las causas ligadas al cromosoma X sindrómicas de FOP se encuentran el Síndrome de Turner (ST) y el síndrome de X frágil. El ST es consecuencia de la pérdida total o parcial de un cromosoma X en un fenotipo femenino, usualmente asociado a talla baja e infertilidad (SYBERT and MCCAULEY 2004). En cerca del 50% de los casos de ST existe una pérdida completa de un cromosoma X mientras que en los restantes se presentan mosaicismos o anomalías estructurales que resultan en fenotipos intermedios (BHARATH *et al.* 2010). La prevalencia del cuadro es de 1/2500 mujeres (SYBERT and MCCAULEY 2004). El fenotipo ST se podría explicar principalmente por la haploinsuficiencia de genes localizados en el cromosoma X que escapan al mecanismo de inactivación (ZINN

and Ross 1998). Uno de los genes localizados en el cromosoma X que escapa a la inactivación es *SHOX*, el cual tiene un papel fundamental en el crecimiento óseo y participa en el fenotipo de la talla baja en las pacientes con ST (RAO *et al.* 1997).

El requerimiento de una doble dosis para ciertos genes en el cromosoma X está ilustrado en que los pacientes muestran pubertad espontánea completa debido a mosaicismos (PASQUINO *et al.* 1997). En mujeres con cariotipo 45,X se presenta una disgenesia gonadal progresiva, aunque el ovario fetal inicia su desarrollo de manera normal, con migración de las células germinales desde el mesodermo y la colonización de las gónadas primarias. Posteriormente, se presenta una apoptosis prematura y acelerada de las células germinales, llevando a la degeneración gonadal en fibras estriadas (SCHLESSINGER *et al.* 2002). En los fetos 45,X de edades gestacionales avanzadas se aprecia característicamente una ausencia de foliculogénesis y un incremento de tejido conectivo gonadal (REYNAUD *et al.* 2004). Se ha encontrado que los niveles de FSH en las pacientes con ST se encuentran característicamente en rango postmenopáusico desde la infancia (FECHNER *et al.* 2006).

El síndrome del X frágil es una patología que se presenta por una expansión mayor a 200 repeticiones del trinucleótido CGG localizado en la región 5'UTR del gen *FMR1* (Xq27.3). Cuando el alelo contiene una expansión entre 55 y 199 repeticiones del mismo trinucleótido, se conoce como premutación y podría expandirse a una mutación en la siguiente generación (ASHLEY *et al.* 1993). Aproximadamente 1/250 mujeres son portadoras de una premutación. Entre ellas un 16% presentará FOP, lo cual si se compara con el riesgo de la población general (1%), muestra un incremento importante en el riesgo para estas mujeres (ALLEN *et al.* 2007). Estudios previos han demostrado que la asociación entre el tamaño de las repeticiones y el riesgo de FOP no es lineal. El riesgo ha mostrado ser mayor en el grupo de portadoras con repeticiones entre 80 y 99, y el riesgo se reduce para los grupos de 59 a 79 y más de 200 repeticiones (ALLEN *et al.* 2007; WITTENBERGER *et al.* 2007).

Una explicación de la asociación entre FOP y la premutación del gen *FMR1* se relaciona con el incremento significativo del transcrito de la forma premutada del alelo que conduce al incremento en la producción de la proteína FMRP. Este factor se une al ARN que regula la traducción del ARNm a través de mecanismos supresores (JIN and WARREN 2000). La FMRP se encuentra altamente expresada en las células germinales de los ovarios fetales y su acumulación podría impedir la correcta expresión de genes necesarios para el desarrollo del oocito (RIFE *et al.* 2004). Además, la acumulación anormal de ARNm de *FMR1* podría tener un efecto citotóxico a largo plazo favoreciendo la atresia folicular (TASSONE *et al.* 2000).

Sobre los defectos localizados en los autosomas que desencadenan la FOP se han descrito cuadros sindrómicos, como la galactosemia, el BPES y el pseudohipoparatiroidismo tipo 1^a.

La galactosemia es una enfermedad hereditaria del metabolismo de la galactosa causado por la deficiencia de la enzima GALT (galactosa-1-fosfato uridiltransferasa). Su incidencia es de 1/30000 a 1/50000 en poblaciones de Norteamérica y Europa. La galactosemia compromete múltiples órganos, entre ellos los ovarios y se ha asociado a la glicosilación inadecuada de las glicoproteínas ováricas (RUBIO-GOZALBO *et al.* 2010). La FOP ocurre en todas las pacientes que presentan mutaciones en estado homocigoto en el gen *GALT* y los niveles de FSH en estas pacientes se encuentran aumentados desde el nacimiento (WAGGONER *et al.* 1990).

El daño ovárico podría ser inducido por la acumulación de metabolitos tóxicos de galactosa que conduce a la apoptosis celular o por la deficiencia de glicoproteínas y glicolípidos relacionados con la FSH y con su receptor, produciendo una disminución en la estimulación ovárica y un aumento en la atresia folicular (PERSANI *et al.* 2010; RUBIO-GOZALBO *et al.* 2010).

El pseudohipoparatiroidismo tipo 1A es una forma de resistencia hormonal generalizada de herencia materna que se presenta por la pérdida de la función del gen *GNAS1* (PATTEN and LEVINE 1990). Este gen codifica para la proteína G que está sujeta a procesos de impronta genómica y que actúa como primer elemento intracelular corriente abajo en la cascada de activación de los receptores de FSH y LH (WEINSTEIN *et al.* 2004). La presencia de resistencia a las gonadotropinas y de FOP en estos pacientes se relaciona con por la expresión preferencial del alelo materno mutado en las gónadas y en los riñones de las mujeres afectadas.

El síndrome Blefarofimosis – Ptosis – epicanto inverso (BPES) es una patología autosómica dominante caracterizada por malformaciones del párpado, asociadas o no a telecanto, con FOP (BEYSEN *et al.* 2005). El único gen conocido asociado a BPES es *FOXL2* (3q23) perteneciente a la familia de factores de transcripción con cajas “*Forkhead*” que codifica para una proteína que contiene un dominio de unión al ADN altamente conservado y un tracto de 14 residuos de alanina (CRISPONI *et al.* 2001; TUTEJA and KAESTNER 2007). Se expresa en la región craneofacial, la hipófisis y el ovario. Durante la organogénesis de la hipófisis, *Foxl2* se expresa en la invaginación del ectodermo oral en la adenohipófisis primordial en ratones (TREIER *et al.* 1998). En humanos se expresa en la cresta urogenital femenina antes de la diferenciación sexual y en adultos en las células de la granulosa y de la teca (COCQUET *et al.* 2003).

Modelos de ratones *Knockout* para *Foxl2* mostraron una disfunción en la transición de las células de la granulosa de escamosas a cuboidales durante la maduración folicular (SCHMIDT *et al.* 2004; UDA *et al.* 2004). En estos modelos la infertilidad es posterior al reclutamiento prematuro masivo de los folículos llevando a la disminución acelerada del *pool* folicular. Además, en diferentes especies *Foxl2* ha sido descrito como un regulador positivo de la expresión de la *CYP19/aromatasa* responsable de la producción de estrógenos en las células de la granulosa (ROSARIO *et al.* 2012). Esto sugiere una influencia directa de *Foxl2* en la señalización estrogénica (GEORGES *et al.* 2014). Estos estudios sugieren una

importante función de *FOXL2* en la fisiología ovárica, por lo que tiene una implicación potencial en la patogénesis de la FOP no-sindromática (LAISSUE *et al.* 2008; LAISSUE 2015). Sorpresivamente, la secuenciación de *FOXL2* en 290 pacientes con FOP no-sindromática, mostró únicamente una mutación potencialmente deletérea (c.898-927del), en una paciente con FOP con amenorrea primaria (DE BAERE *et al.* 2002; HARRIS *et al.* 2002; BODEGA *et al.* 2004; GERSAK *et al.* 2004);(CRISPONI *et al.* 2004).

4.1.3.2.2 Formas no-sindrómicas

Los genes candidatos de la FOP no-sindromática han sido propuestos principalmente por análisis de ligamiento en familias o por el estudio de las características reproductivas de otros mamíferos (BARNETT *et al.* 2006; LAISSUE *et al.* 2008).

FSHR y LHCGR

Los receptores de gonadotropinas *FSHR* y *LHCGR* son esenciales para las funciones reproductivas en ambos sexos. Las mutaciones que llevan a la pérdida de función de estos receptores causan resistencia a gonadotropinas con hipogonadismo hipergonadotrópico (PERSANI *et al.* 2010). Aittomaki y colaboradores en 1995 realizaron un análisis de ligamiento en población finlandesa, encontrando una asociación significativa entre la disgenesia ovárica y el locus 2p21. Este locus contiene ambos genes y la posterior secuenciación completa del gen *FSHR* reveló una mutación no-sinónima (p.Ala189Val) homocigota (AITTOMÄKI *et al.* 1995). Estudios *in vitro* revelaron que el *FSHR* mutado tenía una alteración en su plegamiento, siendo retenido en el citoplasma, causando finalmente una resistencia completa a la FSH (AITTOMÄKI *et al.* 1995; RANNIKKO *et al.* 2002). Las mutaciones en el gen *LHCGR* causales de FOP son menos frecuentes. La evidencia de mujeres con FOP asociada a resistencia a la LH fue obtenida gracias al estudio de familias de hombres afectados con hipoplasia de células de Leydig (LATRONICO *et al.* 1998). El desarrollo de resistencia a la LH asociado a la mutación en *LHCGR* (p.Arg554X) causa un

fenotipo de FOP caracterizado por oligomenorrea o amenorrea secundaria con evidencia de múltiples folículos antrales en la ecografía. La biopsia ovárica mostró todas las etapas del desarrollo folicular hasta el estado pre-ovulatorio, pero con un fallo en la ovulación (PERSANI *et al.* 2010).

TGF- β

La superfamilia de factores de crecimiento TGF- β (*Transforming growth factor beta*), está compuesta por al menos 35 miembros que incluyen proteínas BMP, GDF, TGF- β , actina e inhibina (CHANG *et al.* 2002). De esta familia múltiples proteínas se expresan en el folículo ovárico, tanto en el oocito, como en las células de la granulosa y teca (SHIMASAKI *et al.* 2004). Las TGF β s se sintetizan como factores precursores inactivos (pre-proteínas) constituidas por una secuencia señal, una pro-región y un dominio carboxiterminal funcional o péptido maduro (LIN *et al.* 2003). La pro-región regula el procesamiento post-traducciona l y la dimerización del péptido maduro para formar tanto homodímeros, como heterodímeros proteicos, que son los que finalmente ejercerán una función biológica sobre las células blanco (PERSANI *et al.* 2010). La acción paracrina de las proteínas de esta familia se asocia a una función fundamental en la foliculogénesis. Mutaciones en genes que codifican para TGF- β han sido estudiadas potencialmente como causales de FOP. El estudio de la expresión de miembros de la familia BMP en cascadas de señalización celular durante los ciclos ováricos de la rata, ha permitido entender mejor el rol que tienen en la foliculogénesis (ERICKSON and SHIMASAKI 2003). En humanos, mutaciones en *BMP15* han sido asociadas con FOP no-sindrómica (DI PASQUALE *et al.* 2004; DI PASQUALE *et al.* 2006; LAISSUE *et al.* 2006). Además, variantes en *GDF9*, un paralog o de *BMP15*, podrían potencialmente relacionarse con la FOP (DIXIT *et al.* 2005; LAISSUE *et al.* 2006). Estos dos genes, tienen perfiles de expresión similares en el oocito durante la foliculogénesis y en roedores su expresión se ha observado durante todas las etapas del desarrollo folicular (ERICKSON and SHIMASAKI 2003;

SHIMASAKI *et al.* 2004; LAISSUE *et al.* 2006). Además, ambas proteínas se encuentran involucradas en la regulación de la mitosis y la proliferación de células de la granulosa (MOORE and SHIMASAKI 2005).

Ratones knock-out para los genes *Gdf9* y *Bmp15* ha mostrado fenotipos reproductivos diversos. Los ratones *Gdf9*^{-/-} mostraron una detención de la foliculogénesis en etapas tempranas, mientras que los ratones *Bmp15*^{-/-} fueron sub-fértiles con una fecundidad y una tasa de ovulación reducidas (DONG *et al.* 1996; YAN *et al.* 2001). Además, Peng y colaboradores en el año 2013 establecieron que los heterodímeros de *GDF9:BMP15* en humanos eran los ligandos más bioactivos en la expansión del cúmulo *in vitro* (PENG *et al.* 2013).

El primer reporte de mujeres con mutaciones en *BMP15* relacionadas con un fenotipo caracterizado por FOP fue publicado por Di Pasquale en 2004. Se describieron dos hermanas con amenorrea primaria portadoras de la mutación c.704A >G (p.Tyr235Cys) en estado heterocigoto (heredada del padre). La variante se encontraba localizada en la pro-región y los estudios funcionales realizados mostraron una relación causal con la disminución en la proliferación de las células de la granulosa (DI PASQUALE *et al.* 2004).

El análisis de la secuencia codificante de *BMP15* y de *GDF9* en poblaciones más extensas, permitió encontrar un pequeño número de variantes potencialmente deletéreas (DI PASQUALE *et al.* 2004; DI PASQUALE *et al.* 2006; DIXIT *et al.* 2006; LAISSUE *et al.* 2006). Las variantes heterocigotas localizadas en la pro-región podrían desencadenar la FOP (CHANG *et al.* 2002).

NR5A1

El gen *NR5A1* (9q33.3) codifica para un receptor nuclear expresado en las gónadas humanas desde el desarrollo embrionario temprano. Es esencial para la regulación transcripcional de genes involucrados en el eje hipotálamo-hipófisis-esteroidogénesis, entre los que se incluyen *STAR*, *CYP11A1*, *CYP17A1*, *LH/CGR* e *INHA* (Luo *et al.* 1994). Así mismo, participa en la regulación transcripcional de

genes involucrados en la diferenciación sexual y en la reproducción (e.g. SOX9) (BASHAMBOO and MCELREAVEY 2010). Lourenço y colaboradores en el año 2009 describieron una función de este gen en el desarrollo y la función ovárica. En cuatro familias con FOP se detectaron mutaciones diferentes, ausentes en 700 controles (LOURENÇO *et al.* 2009). Análisis funcionales revelaron que las proteínas mutadas tenían propiedades transcripcionales alteradas reduciendo la transactivación de aromatasas las cuales son esenciales para la biosíntesis de estrógeno por las células de la granulosa (BASHAMBOO and MCELREAVEY 2010).

NOBOX

NOBOX (7q35) es un gen homeobox, que regula el perfil de expresión de otros genes en el oocito, incluyendo *OCT4*, *RFPL4*, *FGF8*, *ZAR1*, *GDF9* Y *BMP15* (RAJKOVIC *et al.* 2004). La disrupción del gen *Nobox* en ratones hembras causó falla ovárica, observándose una acelerada pérdida postnatal de oocitos y el remplazo de los folículos por tejido fibroso (RAJKOVIC *et al.* 2004). La expresión de *NOBOX* en el tejido humano adulto se asemeja a la del ratón, con una expresión preferencial en gónadas (HUNTRISS *et al.* 2006). La expresión en ovarios humanos es específica del oocito y se ha observado desde el folículo primordial hasta la metafase II. Una variante no-sinónima (p.Arg355His) que interrumpía el homodominio de unión al ADN de *NOBOX*, fue reportada en una paciente caucásica con FOP. Esta mutación condujo a una disminución en la capacidad de unión de *NOBOX* al ADN desencadenando una pérdida aumentada de ovocitos (QIN *et al.* 2007).

FIGLA

El gen *FIGLA* (2p13.3) es un factor de transcripción que regula la expresión de genes de la zona pelúcida y que se expresa en las gónadas embrionarias. Ratones hembras knockout para el gen *Figla* no pueden formar folículos primordiales y pierden sus oocitos rápidamente posterior al nacimiento (SOYAL *et al.* 2000). Dos casos de pacientes no relacionadas que presentaban FOP

portadoras de deleciones heterocigotas en el gen *FIGLA*, versus 304 controles en los cuales no se detectaron variantes han sido reportados. Análisis *in vitro* de las mutaciones mostraron una alteración en la heterodimerización de la proteína con otros factores de transcripción asociados, sugiriendo un probable mecanismo para la presentación de la FOP (ZHAO *et al.* 2008a; ZHAO *et al.* 2008b).

STAG3

El gen *STAG3* (7q22.1) codifica para una cohesina implicada en los procesos de reparación, replicación y recombinación del ADN, así como en la estabilidad cromosómica, la regulación transcripcional y la diferenciación celular. Particularmente *STAG3* tiene una función central en el mantenimiento de la cohesión entre cromátides hermanas en los ovocitos de los mamíferos (MEHTA *et al.* 2012). Ratones *Stag3*^{-/-} mostraron esterilidad y el estudio en humanos permitió identificar una mutación con corrimiento en el marco de lectura (c.968delC) en una familia consanguínea con FOP. Todos los miembros de la familia afectados eran homocigotos para la mutación (CABURET *et al.* 2014). Estos resultados indicaron que la FOP sería atribuida en este caso a defectos en la cohesión de cromátides hermanas en la profase del oocito.

NANOS3

El gen *NANOS3* (19p13.13) es miembro de la familia *NANOS* que preferentemente se expresan en los ovarios y tienen una importante función en el desarrollo, la supervivencia y el mantenimiento de las células germinales (TSUDA *et al.* 2003; SANTOS *et al.* 2014). En ratones se ha establecido que *Nanos3* cumple funciones en el mantenimiento de las células primordiales germinales. Se ha descrito una relación entre la cantidad de proteína *NANOS3* expresada y el número de células germinales primordiales en un modelo de ratón. Se ha encontrado una mutación (p.Arg153Trp) en una mujer de origen chino con fenotipo FOP. Se pudo establecer que esta mutación se encuentra en una región altamente conservada evolutivamente. *In vitro* se demostró que esta mutación conducía a

una disminución de la vida media de la proteína NANOS3. Estos resultados sugirieron que la proteína NANOS3 mutante tendía a ser estructuralmente inestable, lo que conduciría a una degradación por el sistema ubiquitin/proteosoma y finalmente a una disminución de los niveles de NANOS3 (Wu *et al.* 2013).

4.2 Técnicas de secuenciación del ADN

El Proyecto Genoma Humano inició su trabajo en 1985, liderado por el departamento de energía y el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América, permitiendo la secuenciación de aproximadamente 3×10^9 pb del genoma humano (CONSORTIUM 2004).

Las técnicas de secuenciación de primera generación están fundamentadas en la metodología publicada en 1977 por Sanger y colaboradores (SANGER *et al.* 1977). Este técnica, conocida también como método de secuenciación enzimático, genera una población de moléculas marcadas radioactivamente representando todos los tamaños y combinaciones posibles (SANGER and COULSON 1975). Además, usa la enzima ADN polimerasa para copiar la cadena molde de ssADN en presencia de una mezcla que contiene los cuatro desoxinucleósidos trifosfato (dNTP) y una menor cantidad de didesoxinucleósido trifosfato (ddNTP). En esta técnica se llevan a cabo cuatro reacciones en paralelo que contienen ddNTP diferentes (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). La ADN polimerasa incorpora los nucleótidos en la nueva cadena a sintetizar y de manera aleatoria incluye el análogo ddNTP en la cadena que sintetiza. Al carecer del extremo 3'-OH la enzima es incapaz de seguir extendiendo el fragmento y por consiguiente la reacción termina (SANGER *et al.* 1977). El producto de cada una de las cuatro reacciones se somete, en cuatro carriles independientes, a electroforesis en gel de poliacrilamida y se revela siguiendo métodos clásicos de autorradiografía (CAMPION and TEC 2004).

Diversos avances y descubrimientos han permitido el desarrollo de métodos para la secuenciación del ADN a partir de la técnica de Sanger. El primero de ellos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una técnica descrita en 1985 por el químico Kary Mullis, que permite la amplificación exponencial de una molécula de ADN generando millones de copias de un fragmento (MULLIS 1990).

Para realizar esta reacción es necesaria una molécula de ADN molde y dos oligonucleótidos complementarios a los fragmentos de la secuencia de ADN que

flanquean la región candidata. Los primers funcionan como un punto de inicio para la adición de nucleótidos (MULLIS *et al.* 1994).

Una reacción de PCR típica realiza múltiples ciclos de amplificación para obtener un número de copias mayor del fragmento de interés. Cada uno de estos ciclos consta de un proceso de desnaturalización de las hebras de ADN con el objetivo de separar la doble cadena. Posteriormente, se efectúa el reconocimiento y la unión de los oligonucleótidos en un proceso conocido como anillamiento que permite la fase de extensión en la cual se adicionan nuevos nucleótidos a la cadena en formación (MULLIS *et al.* 1992).

La enzima Taq polimerasa fue aislada en 1988 a partir de la bacteria *Thermus Aquaticus* (CARBALLEIRA *et al.* 1990). Esta polimerasa resiste altas temperaturas permitiendo automatizar la reacción de PCR sin que se requieran cantidades adicionales de la enzima durante los ciclos. Con esta polimerasa es posible obtener fragmentos uniformes de ADN de hasta ~ 3.5 Kb (INNIS *et al.* 1988).

Otro avance significativo para la automatización de las técnicas de secuenciación está relacionado con el marcaje de las cadenas de ADN sintetizadas. En la descripción inicial de Sanger se emplearon nucleótidos marcados con ^{32}P , los cuales eran separados en un gel de poliacrilamida para finalmente detectar el marcaje al tomar una radiografía (SANGER *et al.* 1977). Nuevas técnicas fueron desarrolladas posteriormente empleando fluoróforos no radioactivos para marcar los fragmentos de ADN. Gracias a las propiedades de estas moléculas fluorescentes fue posible efectuar todas las reacciones de terminación específicas en un solo tubo (PROBER *et al.* 1987).

Estos hallazgos contribuyeron al desarrollo de equipos automatizados capaces de realizar los procesos de secuenciación. En 1986 fue descrita una técnica de secuenciación automatizada que se fundamenta en la utilización de cuatro fluoróforos diferentes para la terminación de la lectura de los fragmentos de ADN (SMITH *et al.* 1986). Esto permitió que la mezcla se cargara sobre un sólo carril de

gel y determinó la absorción de cada banda mediante el uso de un detector óptico. A continuación, los datos obtenidos eran analizados por medio de una computadora que permitió obtener la lectura de aproximadamente 200 bases (SMITH *et al.* 1986). Luego, se desarrollaron nuevos equipos con variaciones en las técnicas de secuenciación automatizada. Este es el caso de los sistemas fundamentados en la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) que tienen la ventaja de leer un mayor número de pares de bases (MAXAM and GILBERT 1977). Su inconveniente consiste en su relativa lentitud dado que implican la preparación del gel y la carga manual. Además, presentan el efecto neurotóxico de la acrilamida (CHRAMBACH and RODBARD 1971). Otro tipo de secuenciación automatizada se fundamenta en un sistema de electroforesis capilar para la separación de las muestras de ADN. Así, es posible una mayor automatización del proceso de secuenciación al no requerir la utilización de geles (Anexo 1) (BEHR *et al.* 1999).

4.2.1 Secuenciación de siguiente generación

La técnica de secuenciación de siguiente generación (NGS) es un método descrito inicialmente en el año 2007. Esta tecnología utiliza nuevas formas de preparación de las muestras, distintas técnicas de secuenciación y nuevos algoritmos de análisis de los datos. La mayor ventaja que ofrece la NGS es la posibilidad de secuenciar grandes regiones de manera simultánea (METZKER 2010). La variedad de nuevas técnicas para la realización de NGS ha permitido que diversas plataformas puedan coexistir.

4.2.1.1 Preparación de las muestras

Las técnicas de NGS requieren primero la preparación de las muestras a secuenciar mediante la fragmentación de las cadenas de ADN. Los fragmentos son inmovilizados en una superficie sólida que permite que se desarrollen miles de reacciones de secuenciación simultáneas. Existen dos métodos de preparación de las muestras que se describen a continuación.

Amplificación Clonal

Debido a que la mayoría de sistemas de NGS no pueden detectar señales bajas de fluorescencia se requiere la amplificación de los fragmentos a través de técnicas de amplificación clonal de muestras. Para este fin, se dispone de dos tipos de PCR que incluyen la PCR en emulsión (emPCR) y la PCR en fase sólida (DRESSMAN *et al.* 2003) (FEDURCO *et al.* 2006).

La emPCR utiliza un sistema libre de células y una librería de fragmentos cuyos extremos se ligan a adaptadores. Estos últimos contienen sitios de reconocimiento para *primers* universales. El ADN se separa en cadenas sencillas y es capturado sobre la superficie de unas perlas para que en cada una de ellas se localice una molécula de ADN. Lo anterior, permite el proceso de amplificación y consecuentemente la inmovilización de las perlas por medio de uno de los siguientes mecanismos: 1. La unión química sobre una superficie de vidrio, 2. La inmovilización sobre un gel de poliacrilamida, 3. El depósito en pocillos individuales de una placa. A continuación, se efectúa el proceso de la secuenciación (LEAMON *et al.* 2003; SHENDURE *et al.* 2005).

En la amplificación en fase sólida o PCR en puente, se unen covalentemente a un soporte de vidrio *primers forward* y *reverse* y se obtienen entre 100 y 200 millones de fragmentos del producto. Estos productos cuentan con extremos libres a los que se hibrida un *primer* universal para iniciar la secuenciación.

Single-molecules templates

La tecnología *Single-molecules templates* requiere una menor cantidad de producto (<1µg) en comparación con la amplificación clonal (20 a 30 µg). Además, no precisa de una PCR previa que induzca mutaciones en el fragmento a secuenciar (METZKER 2010). Antes de efectuarse la secuenciación las muestras son inmovilizadas en una superficie sólida mediante diversos métodos (HARRIS *et al.* 2008). En un primer método, se utilizan *primers* que se unen covalentemente a un soporte sólido. Las muestras se preparan mediante fragmentación al azar en secuencias de 200 pb a 250 pb y se les añaden adaptadores universales en sus

extremos. Posteriormente, El ADN fragmentado se hibrida con los *primers* inmovilizados y la enzima ADN polimerasa se une al complejo *primer*-muestra para iniciar la reacción de secuenciación. Un método alternativo, se fundamenta en la unión de la muestra junto con los adaptadores universales a la superficie sólida. La enzima ADN polimerasa se une al complejo *primer*-muestra para iniciar la reacción de secuenciación. En un tercer método la enzima ADN polimerasa fijada sobre la superficie sólida, se une a la muestra con el *primer*. Con esta técnica se pueden secuenciar moléculas de ADN de mayor tamaño y a diferencia de los dos métodos anteriores se puede utilizar con técnicas de PCR en Tiempo Real (HARDIN *et al.* 2008; EID *et al.* 2009).

4.2.1.2 Secuenciación

Las muestras fijadas en el método de amplificación clonal dan como resultado múltiples fragmentos. Cada uno de estos es sometido a una reacción de secuenciación y el resultado final será un consenso de las diferentes reacciones. La lectura de las muestras fijadas en el método de molécula única se realiza en una única reacción. Diferentes estrategias han sido usadas para este paso de la NGS.

La terminación reversible cíclica (CRT) es una técnica que utiliza terminadores reversibles para la incorporación de cada uno de los nucleótidos (METZKER 2005). Inicialmente la enzima ADN polimerasa unida al fragmento de la muestra incorporará un solo nucleótido complementario fluorescente con un grupo terminador en su extremo 3'. El proceso de síntesis de ADN termina y los nucleótidos sobrantes son lavados. La lectura se efectúa mediante láser para identificar el nucleótido que se ha unido al fragmento de la muestra. Este paso es seguido de un clivaje del grupo terminador del nucleótido fluorescente y un lavado adicional antes de iniciar un nuevo paso de incorporación de nucleótido (BENTLEY *et al.* 2008). La detección puede realizarse mediante un solo color (todos los nucleótidos marcados con el mismo fluoróforo) (Helicos BioSciences) o mediante 4 colores (cada nucleótido marcado con un fluoróforo diferente) (Illumina/Solexa).

La secuenciación por ligación (SBL) es un método cíclico de secuenciación que emplea una ADN ligasa y sondas marcadas con fluorescencia complementarias para una o dos bases. En este método la sonda hibrida con la región complementaria de la muestra y una ADN ligasa une la sonda al *primer*. Las sondas no hibridadas se lavan. Posteriormente, se lee la fluorescencia para determinar la identidad de la sonda ligada. Este proceso se realiza en repetidas ocasiones para identificar la secuencia completa (LANDEGREN *et al.* 1988). Life/APG comercializa una plataforma llamada SOLiD (*Support oligonucleotide ligation detection*) que utiliza el método de SBL (VALOUEV *et al.* 2008; HARISMENDY *et al.* 2009).

La adición de nucleótido único o pirosecuenciación es un método no electroforético basado en bioluminiscencia. Mide la liberación de fosfatos inorgánicos al convertirse en luz visible usando una serie de reacciones enzimáticas (RONAGHI *et al.* 1996; RONAGHI *et al.* 1998). Comercialmente se ha distribuido el pirosecuenciador Roche/454 que vierte automáticamente sobre los pocillos los reactivos necesarios para la reacción y un tipo de dNTP cada vez. En cada pocillo la ADN polimerasa añade uno o más nucleótidos dependiendo de la secuencia molde y se emite luz con una intensidad proporcional al número de nucleótidos incorporados a la nueva cadena (AHMADIAN *et al.* 2006). El secuenciador consta de un sistema óptico especial que recoge el patrón de destellos luminosos que se emiten. Mediante programas informáticos se interpretan estos patrones de luz y se generan unas gráficas que indican si se incorporaron o no nucleótidos. El exceso de nucleótidos y reactivos se lava y se repite el proceso con otro tipo de nucleótido de forma cíclica hasta que finalice la síntesis de la cadena complementaria (DROEGE and HILL 2008).

La secuenciación en tiempo real es un método en el que se incorporan dNTPs marcados con fluoróforos y de manera paralela se realiza una lectura de la fluorescencia del ADN recién sintetizado (METZKER 2010). Este proceso es desarrollado por una enzima ADN polimerasa unida a la superficie de detectores

ZMW (*Zero Mode Waveguide*) cuya función es identificar la secuencia de la nueva cadena (METZKER 2009). El detector está compuesto por un agujero de 10nm de diámetro fabricado en una película de metal (100nm) que evita que la luz visible del láser lo atravesase completamente. Al ser emitida la luz del láser solo se ilumina el fondo del detector. Dentro de cada ZMW se une covalentemente una sola molécula de la ADN polimerasa. Los nucleótidos marcados por encima del detector ZMW no emiten luz y solo emiten fluorescencia cuando difunden por el fondo. Finalmente, se produce la lectura de los nucleótidos una vez la polimerasa los incorpora a la cadena que está siendo sintetizada (EID *et al.* 2009).

4.3 Metaloproteinasas ADAM/ADAMTS

Los genes de las familias *ADAM* y *ADAMTS* son miembros de la superfamilia de metaloproteinasas que incluye diversas proteínas con dominios transmembrana y funciones biológicas diversas. Hasta la fecha se han identificado en el genoma humano 21 genes *ADAM* y 24 genes *ADAMTS*. Cinco de los 24 genes *ADAMTS*, conocidos como *ADAMTS*-like (*ADAMTSL*), carecen de dominio metaloproteinasa (MP) y son inactivos. Los otros 19 codifican proteínas funcionales (BROCKER *et al.* 2009).

4.3.1 Dominios estructurales

Ambas familias codifican proteínas estructuralmente similares y comparten múltiples dominios incluyendo el pro-dominio (PD) regulador de la actividad enzimática de la proteína (Fig. 1). El PD es procesado y removido en la red trans-Golgi antes de que la proteína sea transportada a la membrana celular o secretada a la MEC (ANDERS *et al.* 2001).

Estas proteínas se clasifican como endopeptidasas dependientes de zinc (contienen un motivo de unión al zinc) dentro del dominio metaloproteinasa (MP). La secuencia de aminoácidos que constituye este motivo (HEXGHXXGXXHZ) se encuentra conservada en los miembros de la familia *ADAMTS* (excepto los cinco genes *ADAMTSL*). Diversos miembros de la familia *ADAM* no poseen los residuos conservados de histidina característicos de este motivo, lo que impide la unión del zinc y la actividad metaloproteinasa. Esta característica sugiere que esta región facilita el plegamiento de la proteína o posibilita la interacción proteína-proteína (SAGANE *et al.* 1999).

Inmediatamente después del dominio MP se encuentra el dominio desintegrina. La desintegrina fue originalmente identificada como una pequeña proteína hallada en el veneno de serpiente que bloqueaba la agregación plaquetaria por medio de la interacción con las integrinas (NIEWIAROWSKI *et al.* 1994). Las integrinas se encuentran en la superficie celular y median la interacción célula-célula y célula-

MEC. Este dominio participa en la identificación del sustrato específico (WHITE 2003).

La región carboxiterminal de las proteínas ADAM contiene un dominio EGF-*like*, un dominio transmembrana (TM) y una cola citoplasmática (CT). El dominio TM es el responsable del anclaje de la proteína a la membrana celular y la CT participa en procesos de señalización intracelular (BROCKER *et al.* 2009).

Las proteínas de la familia ADAMTS no poseen los dominios EGF-*like*, TM y CT. En su lugar, contienen dominios trombospondina (TS) que participan en procesos de interacción célula-célula, de angiogénesis y de apoptosis. El número de dominios TS es variable en las diferentes proteínas de la familia ADAMTS desde 15 repeticiones en ADAMTS9 y ADAMTS20 hasta solo una en ADAMTS4 (IRUELA-

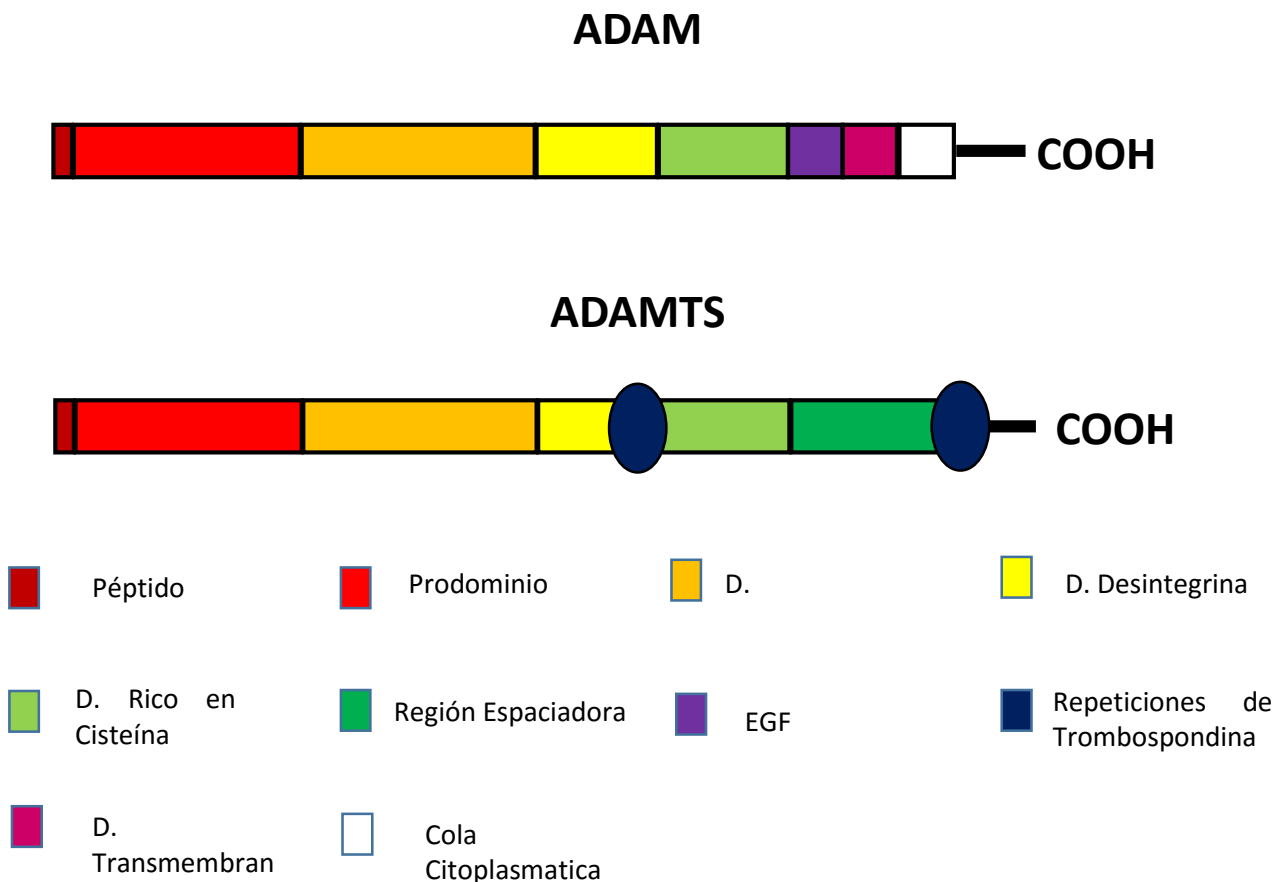


Figura 1. Dominios estructurales de proteínas ADAMTS/ADAM

ARISPE *et al.* 1999).

4.3.2 Regulación de ADAMs

La mayoría de proteínas ADAMs requieren la remoción del pro-dominio mediante una convertasa de pro-proteínas (e.g. furina). Además, se ha determinado que existen proteínas ADAMs que pueden realizar una remoción autocatalítica del pro-dominio. Esta acción permite la activación de la proteína y afecta la conformación, el tráfico a través de la célula y la función de la misma. Diversos estudios para proteínas ADAM-10 y ADAM-17 han determinado que el pro-dominio puede actuar como inhibidor de la actividad de la enzima madura (SEALS and COURTNEIDGE 2003).

Las proteínas ADAMs transmembranales presentan un dominio citoplasmático con secuencia y longitud variable. Este dominio regula la función proteasa de la proteína en respuesta a eventos de señalización intracelular. Además, podría estar involucrado en la respuesta a señales de la MEC debido a la unión de sus ectodominios con diversos sustratos. Un gran número de proteínas que interactúan con los dominios citoplasmáticos de las proteínas ADAMs se han identificado mediante el uso de la técnica en levadura de doble híbrido, la coimmunoprecipitación y el *pull-down* (EDWARDS *et al.* 2008).

Los inhibidores de proteasas TIMPs (Tissue inhibitor of metalloproteinase) han demostrado una alta selectividad por las proteínas ADAMs. Los TIMPs son proteínas de dos dominios. El dominio N-terminal es responsable de la inhibición de la metaloproteinasa y el dominio C-terminal permite la interacción proteína-proteína. Otros inhibidores sintéticos para las proteínas ADAMs han sido desarrollados como agentes terapéuticos principalmente por la importancia que muestra ADAM-17 en los procesos inflamatorios y ADAM-10 en el desarrollo del cáncer (BAKER *et al.* 2002; EDWARDS *et al.* 2008).

4.3.3 Funciones biológicas de ADAMs

Las primeras proteínas ADAM identificadas en mamíferos fueron las dos subunidades de la fertilina, ADAM-1 (fertilina- α) y ADAM-2 (fertilina- β), factores importantes en el proceso de unión y de fusión del espermatozoide con el ovocito (PRIMAKOFF and MYLES 2000). Estas proteínas son procesadas proteolíticamente durante la maduración de la célula espermática por un clivaje posterior al dominio MP. Lo anterior desencadena que los dominios desintegrina de la proteína interactúen con las integrinas presentes en el ovocito. Los ratones *Adam2-Knockout* son infértiles al igual que los ratones *Adam3-Knockout* revelando la importancia de estas proteínas en el proceso de unión del ovocito con el espermatozoide (PRIMAKOFF and MYLES 2002). Existe una relación entre las diferentes proteínas ADAM que se expresan en los espermatozoides ya que la deficiencia de una de estas proteínas conduce a la disminución en la expresión de otras proteínas de la familia que se expresan en la superficie de la célula. Muchos de los genes Adam de ratón específicos de testículos sus homólogos en humanos se presentan como pseudogenes incluyendo a *ADAM1* y *ADAM3*. Otros genes de la familia ADAM como el *ADAM20* son específicos de humanos (EDWARDS *et al.* 2008). Otra función identificada en las proteínas de la familia ADAM es el “*ectodomain shedding*” (ES). Este proceso consiste en la liberación a la MEC de citoquinas o de factores de crecimiento que se encuentran unidos a la membrana celular. Lo anterior es relevante para diferentes modelos de señales de traducción. La identificación de ADAM-17 como el principal regulador corriente arriba de la vía de activación de TNF- α , al procesar proteolíticamente esta citoquina involucrada en procesos inflamatorios de múltiples patologías (e.g. La artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn), permitió inicialmente identificar esta función (ZHENG *et al.* 2004).

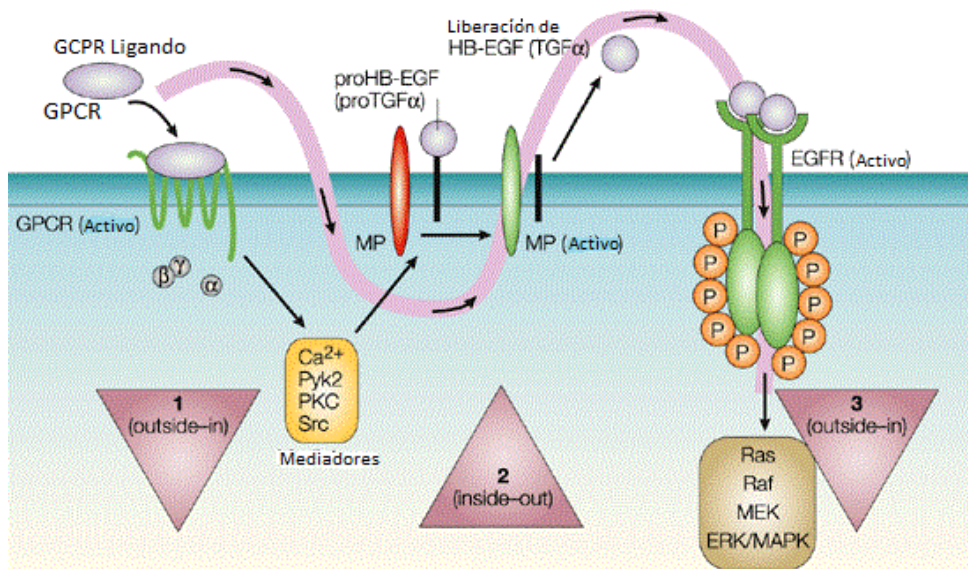


Figura 2. Modelo 'triple-membrane-passing-signalling'. Tomada y modificada de Wetzker & Böhmer, 2003.

Existe evidencia de que la activación del receptor acoplado a proteína G (GPCRs) activa a su vez la señal que permite que las proteínas ADAM liberen el ligando EGF. EGF actúa sobre EGFR permitiendo que se active la vía ERK/MAPK (Fig. 2) (OHTSU *et al.* 2006). Otro proceso en el que están involucradas las proteínas ADAM es la proteólisis intramembrana regulada (RIP), una cascada proteolítica secuencial que implica inicialmente el proceso de "ectodomain shedding" de una proteína transmembrana. Posteriormente, se realiza una escisión dentro de la propia membrana, que genera un fragmento intracelular que permite la transducción de una señal. Los sustratos de la RIP incluyen CD44, N-cadherina, E-cadherina, entre otros. En todos estos casos el clivaje por un ADAM extracelular de la proteína deja una cola transmembrana accesible al clivaje por proteasas intramembrana (e.g. Presenilina). Este clivaje genera un dominio intracelular que se trasloca al núcleo y puede participar en la modulación de la transcripción de diversos genes (EDWARDS *et al.* 2008).

4.3.4 Regulación de ADAMTS

ADAMTS-1 fue identificado en una línea celular de adenocarcinoma de ratones que era regulada por IL-4 (KUNO *et al.* 1997). Los niveles de ARNm de ADAMTS-1, -6 y -9 se encuentran aumentados en respuesta al factor de necrosis tumoral- α en células derivadas de epitelio de retina pigmentaria (BEVITT *et al.* 2003). La expresión de ARNm de ADAMTS-4 se incrementa en los condrocitos articulares ante la presencia de IL-17. Esto indica que las proteínas ADAMTS tienen una función relevante en procesos inflamatorios (JONES and RILEY 2005).

La regulación post-transcripcional mediante *splicing* alternativo se ha identificado en proteínas ADAMTS-6, -7 y -9. Así mismo, se encontraron múltiples codones ATG corriente arriba del sitio de inicio de la traducción seguida de marcos de lectura abiertos cortos. Estos reclutan ribosomas llevando a que la traducción de la proteína sea reducida (BEVITT *et al.* 2005).

Las proteínas ADAMTS son sintetizadas como pro-enzimas que requieren la remoción del pro-dominio por una convertasa. En las ADAMTS que son secretadas adicionalmente se producen diversos procesamientos en C-terminal (RODRÍGUEZ-MANZANEQUE *et al.* 2000). En ADAMTS-1 y -4 se identificó que se realiza un clivaje en la región espaciadora y ADAMTS-12 sufre un clivaje que libera las repeticiones de trombospondinas. El clivaje de ADAMTS-1 y -4 reduce su afinidad por la heparina sugiriendo que la región espaciadora participa en esta interacción (GAO *et al.* 2002). Para ADAMTS-13 la remoción de la región espaciadora desencadena una marcada reducción en la actividad de escisión del factor de Von Willebrand. Por lo tanto, la región espaciadora puede influir en la actividad de los dominios catalíticos de las proteinasas ADAMTS (SOEJIMA *et al.* 2003; JONES and RILEY 2005).

El inhibidor endógeno más importante para las proteínas de la familia ADAMTS es TIMP-3. Así mismo, otros miembros de la familia TIMP poseen una capacidad inhibitoria reducida. La región C-terminal de la fibronectina ha demostrado ser un potente inhibidor de ADAMTS-4 (KASHIWAGI *et al.* 2001).

4.3.5 Funciones biológicas de ADAMTS

4.3.5.1 Anti-angiogénesis: ADAMTS-1 y -8

Estas proteínas pueden inhibir la angiogénesis inducida por VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y suprimir la vascularización inducida por el factor de crecimiento de fibroblastos-2. La actividad anti-angiogénica es mediada por las repeticiones de trombospondina. La TSP1 puede interactuar con el receptor de glicoproteínas de membrana CD36 en las células endoteliales (IRUELA-ARISPE *et al.* 1999; VÁZQUEZ *et al.* 1999).

4.3.5.2 Agrecanasas: ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9 y -15

Agrecan es el principal proteoglicano de cartílago y es responsable de la resistencia del tejido a la compresión. Contiene dos dominios N-terminales globulares, G1 y G2, separados por un dominio interglobular (IGD), seguido por una región de unión GAG y un dominio globular C-terminal, G3. El dominio G1 interactúa con el ácido hialurónico y permite formar agregados proteicos en la matriz de colágeno del cartílago. El agrecan protege el colágeno de la degradación del cartílago (PRATTA *et al.* 2003). Los principales sitios de corte que causan disminución del agrecan del cartílago se encuentran en el dominio IGD. Las proteínas agrecanasas mas estudiadas son ADAMTS-4 y -5. Estas también pueden clivar el brevican, un proteoglicano de condroitín sulfato, que es expresado en el sistema nervioso central y el versican presente en vasos sanguíneos (TORTORELLA *et al.* 2001; PORTER *et al.* 2005).

4.3.5.3 Proteinasa de procolágeno: ADAMTS-2, -3, -14

Estas proteínas ADAMTS se encuentran involucradas en el procesamiento del procolágeno a colágeno removiendo el pro-péptido N-terminal (COLIGE *et al.* 1997). ADAMTS-2 actúa sobre el procolágeno I, II y III y mutaciones en este gen se encuentran asociadas con la aparición en humanos del síndrome de Ehlers-Danlos tipo dermatosparaxis. Este síndrome está caracterizado por tejidos extremadamente frágiles, piel hiperextensible y facilidad para sufrir hematomas.

ADAMTS-3 actúa sobre el procolágeno II y ADAMTS-14 sobre el procolágeno I (FERNANDES *et al.* 2001).

4.3.5.4 Proteasa de clivaje del factor de von Willebrand: ADAMTS-13

El Factor de Von Willebrand es una proteína multimérica presente en el plasma, las plaquetas y las células de la vasculatura endotelial. Esta proteína unida al factor VIII permite la agregación plaquetaria. ADAMTS-13 se encarga de clivar al factor de Von Willebrand con el fin de limitar su actividad. La deficiencia del mismo desencadena la púrpura trombocitopénica trombótica una enfermedad caracterizada por trombocitopenia, anemia hemolítica y disfunción renal (SOEJIMA *et al.* 2001; ZHENG *et al.* 2003).

4.3.6 Proteínas ADAMTSL

Son proteínas estructuralmente similares a las proteínas ADAMTS pero que no presentan dominios desintegrina y metaloproteinasa. Presentan un péptido señal, repeticiones de trombospondina, un dominio rico en cisteína, una región espaciadora y finalmente otras repeticiones de trombospondina (PORTER *et al.* 2005). Actualmente 6 miembros de esta familia han sido identificados y su función es desconocida. Sin embargo, mutaciones en *ADAMTSL2* se encuentran relacionadas con la displasia gelefísica, una patología esquelética caracterizada por estatura baja, anomalías prominentes en manos y pies, y un aspecto facial característico (Nariz corta, hipertelorismo, filtro largo y borrado, labio superior delgado). Además, mutaciones en *ADAMTSL4* se asocian con ectopia lentis aislada, una enfermedad caracterizada por desplazamiento parcial o total del lente ocular (LE GOFF and CORMIER-DAIRE 2011).

4.3.7 ADAMTS en relación con la fertilidad

La expresión de los genes de diferenciación gonadal se da aproximadamente en E11.5 en ratones y en la sexta semana post-concepción en humanos (COVENEY *et al.* 2008). Las gónadas de ratones femeninos muestran una elevación del ARNm de *Adamts19* a partir del día E12.5, y sigue siendo mayor en el ovario postnatal que en el testículo (MENKE and PAGE 2002). Otras dos proteínas ADAMTS se han

encontrado involucradas en la gonadogénesis. En aves *Adamts12* se encuentra elevado en testículos pero no en ovarios al momento de la diferenciación sexual (CARRÉ *et al.* 2011). Por el contrario, *Adamts11* aumenta en ovarios en desarrollo y no en testículos. *Adamts16* fue identificado en los testículos y en los ovarios de roedores en E13, en espermatídes y células de la granulosa de machos y hembras, respectivamente. El *Knockdown* del gen *Wt1* aumentó el ARNm de *Adamts16* en machos, pero disminuyó en hembras indicando que su expresión es corriente abajo de *Wt1*. Ratones machos *Knockout* para *Adamts16* muestran criptorquidia y esterilidad demostrando su importancia en el desarrollo adecuado de los testículos (JACOBI *et al.* 2014).

Durante la foliculogénesis se ha identificado la expresión de diversos miembros de ADAMTS. *Adamts1*, 4, 5, 9 y 15 se expresan predominantemente en células de la granulosa de mamíferos (RICHARDS *et al.* 2005; PELUFFO *et al.* 2011; RUSSELL *et al.* 2015). La FSH induce la expresión de *Adamts1*, 4 y 16 en ratones, sugiriendo que se encuentran involucradas en el desarrollo folicular. Además, *Adamts1* en ratones se expresa en la membrana basal folicular al igual que su sustrato, el versican. Esto sugiere que el clivaje del versican por parte de ADAMTS-1 contribuiría a la remodelación estructural del folículo necesaria para su maduración (GAO *et al.* 2007). *Adamts1* también se encuentra involucrado en la fase de ovulación. Su expresión en células de la granulosa es inducida por el receptor de progesterona (*Pgr*) (ROBKER *et al.* 2000). Ratones *Knockout* para *Pgr* son infértiles y muestran disfunciones de ovulación. En estos ratones no se presenta un incremento en la expresión de *Adamts1* en el periodo periovulatorio, sugiriendo que ADAMTS-1 es una proteasa que media en la ruptura folicular. Un estudio realizado en humanos mostró expresión de *ADAMTS1* y *ADAMTS9* en células de la granulosa en el periodo pre-ovulatorio y etapas tempranas de la ovulación (ROSEWELL *et al.* 2015). Además, la expresión aumentada de *ADAMTS1* y *ADAMTS9* se ha notificado en las células foliculares aisladas de ovocitos maduros en comparación con las que se detuvieron en una etapa temprana del desarrollo (RUSSELL *et al.* 2015).

4.4 ADAMTS19

El gen *ADAMTS19* (*A Disintegrin-like and Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif, 19*) (MIM *607513) fue mapeado mediante el análisis de secuencias genómicas en la región cromosómica 5q31 (CAL *et al.* 2002). La homología de los dominios metaloproteinasas de proteínas ADAMTS, permitió identificar a ADAMTS19 en bases de datos genómicas. Se obtuvo el clon completo del gen por PCR de tejido fetal en librerías de ADNc (CAL *et al.* 2002). El gen está constituido por 23 exones codificantes con una longitud de 5234pb, una región 5'UTR de 145 pb y una región 3'UTR de 1465 pb (CAL *et al.* 2002; PORTER *et al.* 2005).

Diversos estudios han permitido identificar la expresión de *ADAMTS19*. Inicialmente se realizó una amplificación por PCR a partir de una librería de ADNc de tejido humano y se demostró la expresión en pulmón fetal. Además, el análisis por *Northern blot* de ARN de líneas celulares tumorales humanas permitió identificar su expresión en tejido de osteosarcoma (CAL *et al.* 2002). Posteriormente, a partir de ADNc de cartílago articular se identificó mediante PCR en tiempo real una expresión elevada en tejido cartilaginoso normal y con osteoartritis (KEVORKIAN *et al.* 2004).

Estudios realizados a partir de ADNc extraído de gónadas embrionarias de ratones machos y hembras (E12.5), demostraron una expresión elevada de *Adamts19* en el tejido ovárico. Esta expresión se evidencio desde el día E12.5 hasta el día E15.5 del desarrollo embrionario. Se identificó una expresión débil en testículos embrionarios entre E14.5 y E15.5. De la misma manera, análisis en hembras a los 8 días postparto reveló una expresión predominante en el ovario. En el riñón, el corazón, el músculo esquelético, los pulmones y los testículos se detectaron niveles bajos de expresión génica (MENKE and PAGE 2002). Recientemente, se estudiaron embriones de ratones *knockdown* para *Adamts19*. Mediante la técnica de inyección cardiaca de morfolinós en E11.5 se realizó un seguimiento por 48 horas de cultivos de tejido gonadal. Los resultados no revelaron alteraciones morfológicas, cambios celulares o variaciones en la expresión de los genes de

diferenciación gonadal (e.g. *Fst*, *Irx3*, *Amh*, *Cyp11a1*, *Nr5a1*) (McCLELLAND *et al.* 2015).

ADAMTS-19 pertenece a la subfamilia de metaloproteinasas ADAMTS. Estas proteínas fueron descritas inicialmente en ratones por Kuno *et al.* En 1997. Desde entonces se han identificado en otros mamíferos y en *Caenorhabditis elegans* (KUNO *et al.* 1997). Están estructural y evolutivamente relacionadas con ADAM y de manera más distante con proteínas MMP (*matrix metalloproteinase*) (JONES and RILEY 2005).

Las proteínas ADAMTS son secretadas hacia la matriz extracelular en donde se unen a proteínas con las cuales interactúan. ADAMTS-19 está incluida dentro del grupo de “*Orphan ADAMTS*” denominadas de esta manera porque no se han descrito sus sustratos específicos (PORTER *et al.* 2005; RUSSELL *et al.* 2015). El análisis de la secuencia de aminoácidos y su homología con proteínas previamente conocidas permitió determinar los dominios estructurales presentes en ADAMTS19 y que corresponden a (Fig. 3):

Un péptido señal seguido de un pro-dominio de aproximadamente 200 aminoácidos (aa) encargado de mantener la latencia enzimática.

Un dominio catalítico metaloproteinasa de 225 aa que contienen el sitio activo de la enzima en la región de unión al zinc.

Un dominio desintegrina-like de 80 aa que incluye 8 residuos de cisteína característicos de esta región. Este dominio confiere a la proteína la capacidad para unirse a receptores de integrina de la superficie celular, potenciando de esta manera su capacidad proteolítica (PORTER *et al.* 2005).

Repeticiones centrales de trombospondina caracterizadas por la presencia de tres residuos de triptófano en una secuencia de 20 aa. ADAMTS-19 presenta una delección de tres residuos incluyendo el segundo triptófano. Este dominio cumple funciones de interacción con factores de crecimiento, citosinas, componentes de la MEC o de la superficie celular (ADAMS and LAWLER 2004).

Un dominio rico en cisteína que contiene 10 residuos conservados. Este dominio se encuentra relacionado con la localización sub-celular de las proteínas y la especificidad de sustrato (MOCHIZUKI and OKADA 2007; TORTORELLA *et al.* 2009).

Una región espaciadora compuesta por 124 aa y sin características estructurales específicas.

Un segundo módulo que contiene cuatro repeticiones de trombospondina.

Un dominio proteasa-lacunina (PLAC) que contiene 40 aa con seis residuos conservados de cisteína y su función molecular consiste en la catálisis de la hidrólisis de un enlace peptídico (CAL *et al.* 2002; PORTER *et al.* 2005; APTE 2009).

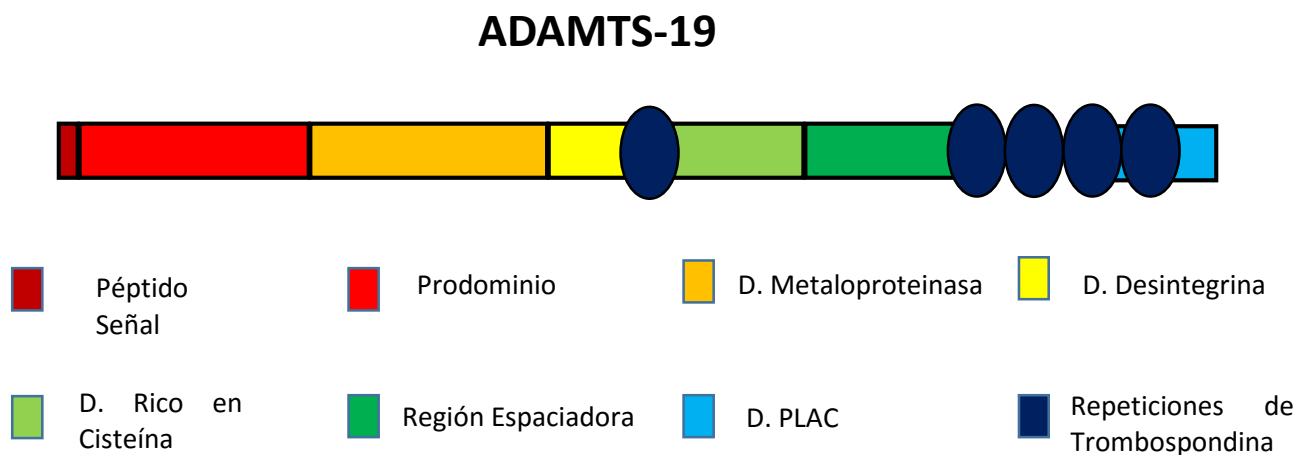


Figura 3. Dominios estructurales proteína ADAMTS-19.

Knauff y colaboradores realizaron un estudio de asociación de genoma completo (GWAS) obteniendo como resultado la asociación del SNP rs246246 localizado en el intrón 21 de *ADAMTS19* con la FOP (KNAUFF *et al.* 2009). Aunque la cohorte de replicación no confirmó la asociación, *ADAMTS19* puede ser considerado como un candidato para la FOP (MENKE and PAGE 2002).

Recientes estudios en humanos sugieren que epistasis entre polimorfismos en los genes *IGF2R* (Insulin-like growth factor 2 receptor) y *ADAMTS19* se asocian con la FOP (PYUN *et al.* 2013). *IGF2R* aumenta la producción de progesterona en las

células de la granulosa, y a su vez esta hormona regula la expresión de diversas proteínas ADAMTS (SPICER and AAD 2007; FORTUNE *et al.* 2009). En consecuencia, *ADAMTS19* podría ser regulado por la progesterona la cual es controlada por IGF2R. Las interacciones entre SNPs y diplotipos de *IGF2R* y *ADAMTS19* contribuirían al desarrollo de la FOP (PYUN *et al.* 2013). Un estudio posterior reportó que las interacciones sinérgicas entre SNPs localizados en *ACVR2B* (*activin A receptor, type IIB*) y *ADAMTS19* se asocian con susceptibilidad para el desarrollo de la FOP (PYUN *et al.* 2015).

4.5 COL6A2

El gen *COL6A2* (*Collagen, Type VI, Alpha-2*) (MIM*120240) fue identificado mediante un tamizaje con anticuerpos contra las cadenas de colágeno en una biblioteca de ADNc. Permitiendo caracterizar los ADNc humanos específicos para *COL6A2*. Clones de ADNc se utilizaron para mapear el gen en 21q22.3 mediante hibridación de células somáticas e hibridación in situ (WEIL *et al.* 1988). El gen está constituido por 28 exones, 27 son codificantes, con una longitud de 3461pb, una región 5'UTR de 104 pb y una región 3'UTR de 297 pb (GELSE *et al.* 2003).

COL6A2 hace parte de la familia de proteínas del colágeno conformada por 34 miembros diferentes. Los colágenos son proteínas estructuralmente formadas por tres cadenas polipeptídicas que forman característicamente estructuras de triple hélice (VON DER MARK 1999). Todos los miembros de la familia del colágeno forman estas estructuras en matriz extracelular. 26 tipos de colágeno distinto han sido descritos hasta la fecha (SATO *et al.* 2002). Su función está relacionada con el mantenimiento de la estructura de la matriz extracelular y son el principal elemento de todos los tejidos conectivos contribuyendo a la estabilidad de los órganos (GELSE *et al.* 2003).

La proteína COL6A2 hace parte estructural del colágeno tipo VI (microfibrilar). El colágeno tipo VI es un heterotrímero compuesto por tres cadenas distintas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$). Posee dos dominios globulares de igual diámetro, separados por un dominio helicoidal corto de 110 nm; tiene una secuencia de 335 a 336 residuos de aminoácidos, donde la cisteína forma puentes que estabilizan la molécula (KEENE *et al.* 1988). Desempeña una función importante en las interacciones entre los diferentes componentes de la matriz extracelular y tiene particular importancia en el reconocimiento de la integrina $\alpha 2\beta 1$ que regula la adhesión y diferenciación celular. Al ser secretado a la matriz extracelular, el colágeno tipo VI forma una red microfibrilar en prácticamente todos los tejidos conectivos, excepto el tejido óseo.

Las microfibrillas le dan una disposición semejante a la cuentas de un rosario (SILVERA and BARRIOS 2012).

Las enfermedades relacionadas con mutaciones en el colágeno de tipo VI representan un espectro de fenotipos desde la miopatía de Bethlem hasta la distrofia muscular congénita de Ullrich. La miopatía de Bethlem, se caracteriza por debilidad muscular proximal y contracturas variables y afecta con mayor frecuencia los flexores de los dedos, los codos y los tobillos. La distrofia muscular congénita de Ullrich se caracteriza por la debilidad congénita e hipotonía, contracturas articulares proximales e hiperlaxitud de las articulaciones distales (LAMPE *et al.* 2012).

5 Preguntas Científicas

¿Puede la secuenciación de siguiente generación identificar variantes potencialmente etiológicas en genes candidato de FOP de manera eficiente?

¿Es la variante p.Thr943Ile en ADAMTS19 causal del fenotipo?

6 Objetivos de la Investigación

6.1 Objetivo general

- Determinar si la secuenciación de siguiente generación es eficiente para la identificación de variantes potencialmente causales de FOP.
- Identificar variantes de secuencia potencialmente causales FOP
- Efectuar ensayos funcionales que permitan describir mutaciones causales en nuevos genes POF.

6.2 Objetivos específicos

- Identificar variantes en la región codificante de 70 genes candidatos de FOP en 12 mujeres afectadas mediante el uso de NGS.
- Identificar las potenciales proteínas que interactúan con ADAMTS19.
- Determinar si la mutación p.Thr943Ile en ADAMTS19 afecta alguna de éstas interacciones.

7 Materiales y Métodos.

7.1 Secuenciación de siguiente generación.

7.1.1 Población de Estudio

Las pacientes y los controles de origen colombiano asistieron a la unidad de fertilidad de la clínica Marly (Bogotá, Colombia) y/o a la unidad de genética de la Universidad del Rosario (Bogotá, Colombia). Doce mujeres afectadas por FOP (POF-3, -4, -7, -9, -10, -11, -13, -17, -19, -23 y -136) fueron incluidas en el estudio. El grupo control (GC) incluía 176 mujeres y un grupo adicional de 345 mujeres (grupo de población general [GP]; edades entre 19 años y 63 años) del mismo origen étnico fueron reclutadas para valorar la frecuencia alélica de los alelos potencialmente deletéreos. Todos los estudios clínicos y experimentales fueron aprobados por el comité de ética de cada una de las instituciones participantes. Todos los individuos firmaron un consentimiento informado.

- Criterios de Inclusión del grupo FOP:
 - ~ Amenorrea mayor a 6 meses antes de los 40 años de edad.
 - ~ Niveles de FSH plasmáticos elevados (>40 UI/ml).
 - ~ Cariotipo 46,XX.
- Criterios de exclusión del grupo FOP:
 - ~ Antecedentes de cirugía pélvica, quimio o radioterapia, infección ovárica y/o enfermedad autoinmune.
- Criterios de inclusión del grupo control:
 - ~ Menopausia después de los 50 años de edad.
 - ~ No antecedentes de enfermedades ginecológicas.
 - ~ Ciclos menstruales regulares durante la vida reproductiva.
 - ~ Haber tenido por lo menos un hijo.

7.1.2 Extracción del ADN

Se tomaron 10 ml de sangre periférica en tubos con EDTA de cada individuo participante. El ADN total fue extraído de los leucocitos utilizando la técnica

fenol/cloroformo. Mediante centrifugación fueron obtenidos los leucocitos de los que se aisló el ADN. La capa de leucocitos obtenida fue sometida a lisis por adición de 500 ul Tris-Cl, 10 mM- EDTA, 5mM pH: 8.0 frio. La lisis celular fue completada agregando 5 ml de buffer de lisis (LSN). Se mezcló suavemente por inversión. A lo anterior se le adicionó 2.5 ml de fenol, y se mezcló suavemente por inversión durante 5 min. Se agregaron 2.5 ml de Cloroformo-Isoamílico 1:24. Se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 min y se obtuvo el sobrenadante. Se adicionaron 2.5 ml de fenol, 2.5 ml de cloroformo y se mezcló por inversión durante 5 min. Se centrifugó a 3.000 rpm por 10 min. Se adicionaron nuevamente fenol y cloroformo. Se mezcló suavemente por inversión por 5 min y se centrifugó 10 min a 3.000 rpm. Se obtuvo el sobrenadante y se adicionaron 1/10 del volumen en NaCl 5M. Se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se pasó por soluciones de etanol al 90%, 80% y 70% con el fin de retirar el exceso de sales. Posteriormente, se dejó secar y el pellet fue resuspendido en 700 ul de Tris 10 mM- EDTA, 1 mM pH:8.0, e incubado a 56°C durante 1 hora. La concentración de ADN se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c de ThermoScientific.

7.1.3 NGS

La NGS se realizó a las 12 mujeres afectadas por FOP. Se seleccionaron 70 genes de interés para el microarreglo de secuenciación de nueva generación después de explorar las bases de datos públicas: *Pubmed*, *Highwire*, *GEO profiles*, *MGI*, entre otras. Para la búsqueda de la literatura en internet se incluyeron los términos “*genetics of sex determination*,” “*genetics of folliculogenesis*,” “*genetics of ovulation*,” “*gene expression and ovary*,” “*ovary and transcriptomics*,” “*mouse models of premature ovarian failure*,” “*premature ovarian failure*,” “*premature ovarian failure genetics*,” and “*primary ovarian insufficiency*”. Adicionalmente, revisamos reportes previos de análisis de secuenciación realizados en pacientes con FOP para identificar aquellos genes que mostraran pruebas funcionales positivas. La base de datos MGI (*Mouse Genome Informatics*) fue usada específicamente para explorar los fenotipos murinos de FOP. La

herramienta GEO profiles del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) fue usada para evaluarlos los perfiles de expresión de los genes seleccionados. La secuenciación del genoma humano (Build Hg19) para la región codificante de los 70 genes de interés fue obtenida del *UCSC Genome Browser* (Anexo 2).

Un total de 241,399 sondas que comprendían los exones de los 70 genes y 2,105 sondas control fueron introducidas en un *array* Agilent's 1X244K. 130 µl de agua libre de nucleasas fueron agregados a tres microgramos del ADN genómico de cada paciente. Se sometieron a sonicación para fragmentar el ADN en tamaños entre 100pb y 200pb. El tamaño de los fragmentos se comprobó en el Bioanalyzer HS Chip de Agilent. El ADN fragmentado fue seleccionado usando perlas Agencourt AMPure XP SPRI (Beckman Coulter). Posteriormente, las librerías de ADN genómico fueron construidas de acuerdo al protocolo de preparación de muestras para secuenciación del ADN genómico (Illumina). El ADN fue sometido a una serie de reacciones enzimáticas para reparar los extremos fragmentados, adherir un nucleótido único "A" al extremo 3' del ADN fragmentado y ligar adaptadores. Después de la ligación, la amplificación por PCR (10-12 ciclos) fue realizada. Para el proceso de secuenciación se utilizó el secuenciador Illumina GAI.

Las secuencias obtenidas del sitio web de la base de datos Ensembl fueron usadas para determinar substituciones de aminoácidos. La potencial baja calidad de las muestras y la contaminación de los adaptadores fue filtrada usando el software BLAT. Los datos de alta calidad fueron filtrados y alineados con el genoma humano de referencia usando el software BWA 0.5.9rc1 (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) y las variantes fueron identificadas usando samtools-0.1.7 (<http://samtools.sourceforge.net/>). Las variantes fueron posteriormente filtradas con base en la profundidad y la calidad de las lecturas. Las variantes filtradas fueron anotadas, junto con su efecto potencial, usando el software snpEFF 3.4i (<http://snpeff.sourceforge.net/>). Los resultados fueron comparados con la base de datos dbSNP (NCBI versión db137). Esto permitió identificar las variantes no

descritas anteriormente. Las variantes anotadas fueron posteriormente revisadas manualmente. El laboratorio Genotypic technology realizó la secuenciación del exoma y el análisis primario de los datos. Las secuencias *Wild Type* humanas de ADAMTS19 (gij112789555), BMPR2 (gij15451916) y LHCGR (gij106067657) fueron usadas para los alineamientos múltiples de proteínas (ClustalW software), para estudiar la conservación durante la evolución de los residuos intercambiados.

7.1.4 Diseño de Primers

La secuencia de oligonucleótidos, para amplificar el exón 19 de *ADAMTS19*, se diseñó empleando el programa Primer3. Este programa considera entre otros, los parámetros de temperatura de *melting*, la longitud del primer, el porcentaje de GCs, la formación de dímeros y la formación de estructuras secundarias. Los primers de PCR se diseñaron fuera de la región codificante para secuenciar todo el marco abierto de lectura correspondiente. Para el proceso de secuenciación se diseñó un primer interno. Los primers se verificaron por medio de BLASTN.

Tabla 1. Primers de amplificación de *ADAMTS19*

Gen	Secuencia del <i>primer</i>	
ADAMTS19 Exón 19	Forward	5'AAATGATGAATATCCAACCTACCCTGA3'
	HuADAMTS19ex19-1F	
	Reverse	5'TCTTAATTACTCCTCAGCAACCATCC3'
	HuADAMTS19ex19-1R	

Tabla 2. Primers de secuenciación de *ADAMTS19*

Gen	Secuencia del <i>primer</i>	
ADAMTS19 Exón 19	Forward	5'TCACATATACCCTGAAAATGTATAC3'
	HuADAMTS19ex19-2F	

7.1.5 Amplificación del ADN

La amplificación de la región codificante del exón 19 del gen *ADAMTS19* fue llevada a cabo en la paciente POF-7, en el GC y en el GP. Se utilizaron los

oligonucleótidos mencionados anteriormente. El fragmento amplificado tiene una longitud de 601 pb. La reacción de PCR se realizó según las siguientes especificaciones.

Tabla 3. Programa del termociclador para la PCR para la amplificación del exón 19 del gen *ADAMTS19*

Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®		TIEMPO
Desnaturalización Inicial	95°C	10 minutos
Numero de ciclos	35 ciclos	
Desnaturalización	95°C	1 minuto
Anillamiento	65°C	45 segundos
Elongación	72°C	40 segundos
Elongación final	72°C	10 minutos
Conservación	4°C	

La amplificación se comprobó analizando 5ml del producto de cada reacción de PCR por electroforesis en un gel de agarosa al 1% disuelto en buffer TBE 1X. Se utilizó un patrón de peso molecular (1kb *Plus DNA Ladder*) para identificar las tallas de los fragmentos. El producto de PCR fue purificado mediante fosfatasa alcalina y exonucleasa I antes de la secuenciación. La secuenciación directa fue efectuada con el primer interno usando un secuenciador capilar (*Applied Biosystems*). El análisis de las secuencias fue realizado a través de alineamientos múltiples usando el programa clustalW. Se comparó la secuencia del paciente frente a la secuencia *Wild Type* del exón 19 de *ADAMTS19* obtenida de la base de datos Ensembl.

7.1.6 Análisis *in silico*

Las herramientas bioinformáticas Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen2) y *Sorting intolerant from tolerant* (SIFT) fueron usadas para establecer los potenciales efectos deletéreos de las variantes encontradas a nivel de la proteína.

Los valores de predicción de PolyPhen2 resultan de un algoritmo que utiliza el análisis comparativo de secuencias de proteínas de diferentes especies, las características fisicoquímicas de los aminoácidos intercambiados y el mapeo de la sustitución de residuos con respecto a las estructuras tridimensionales disponibles de las proteínas. Los resultados son evaluados como “benigna”, “posiblemente deletéreos” o “probablemente deletéreos” (ADZHUBEI *et al.* 2010). El programa SIFT utiliza las características de hidrofobicidad de los aminoácidos y la conservación entre especies (similitud de la secuencia de proteínas) para establecer la probabilidad de efectos deletéreos causados por mutaciones *missense* (NG and HENIKOFF 2003).

7.2 Estudio de la interacción proteína-proteína

La proteína ADAMTS19 se clasifica dentro de la familia ADAMTS como huérfana ya que no se ha identificado su sustrato. Se han reportado diferentes métodos de análisis de unión de proteínas, como el sistema de doble híbrido en levaduras. Este ensayo fue usado en el presente estudio para identificar las potenciales proteínas de interacción de ADAMTS19.

7.2.1 Sistema de doble híbrido en levaduras

El sistema de doble híbrido en levaduras usa el proceso de transcripción para identificar interacciones proteína-proteína. Se fundamenta en la reconstitución de un factor de transcripción (FT) funcional seguido de la expresión de un gen reportero en células de levadura genéticamente modificadas. Una vez se produce la unión física de la proteína de interés (unido al dominio de unión de ADN del FT) a un fragmento de proteína de las librerías de ADNc (unida al dominio de activación del FT), el dominio de unión al ADN del factor de transcripción se aproxima al dominio de activación. La reconstitución del factor de transcripción funcional activa la transcripción del gen reportero HIS3. Las levaduras pueden crecer en un medio selectivo carente de histidina. El ADN de los clones positivos es posteriormente secuenciado y analizado para identificar la proteína de interés (Fig. 4) (GIETZ *et al.* 1997).

ULTimate Y2H Principle

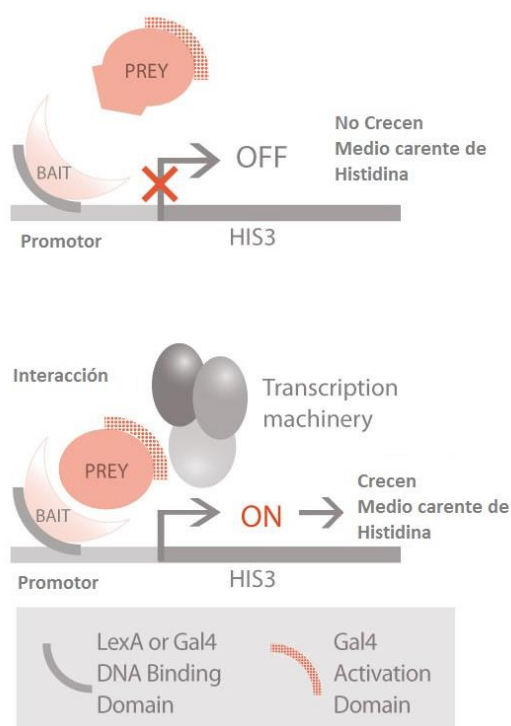


Figura 4. Principio del tamizaje de doble híbrido ULTimate Y2H (Hybrigenics). Bait: Proteína de interés, Prey: Proteínas de interacción - librería.

El sistema de doble híbrido en levadura fue realizado en el laboratorio Hybrigenics en París, Francia (www.hybrigenics.com). La proteína “bait” fusionada al dominio de unión de ADN del factor de transcripción, fue generada de clones de ADNc de *adamts19-Mus musculus* (Gene ID:240322) en los vectores p27 y pB66. La proteína fusión traducida contenía un fragmento de Adamts19 de 535 aminoácidos (aa 637-1172). Se encontraban presentes los dominios de Adamts19 correspondientes a: *thrombospondin type 1 repeat* (SM0029 o PF00090), ADAM-TS Spacer 1 (PF05896) y PLAC (PF08686). El dominio *thrombospondin type 1 repeat* es la región en la que se encuentra la mutación en la paciente POF-7. Las proteínas “prey” fusionadas al dominio de activación del factor de transcripción, fueron generadas de clones de una librería de ADNc de ovario de *Mus musculus* en los vectores p27 y pB66. Un total de 148.2 millones de interacciones fueron evaluadas. Después de la selección sobre el medio deficiente de histidina, los

clones positivos fueron elegidos y los fragmentos correspondientes al “prey” se amplificaron y secuenciaron en sus extremos 3’ y 5’.

Para cada interacción, los resultados fueron expresados en un Puntaje Biológico Predicho (PBS) que calcula la fiabilidad de la interacción. Se fundamenta en la comparación entre el número de fragmentos de las proteínas sustrato que interactúan con la proteína de interés y la posibilidad de que estos hallazgos se deban al azar. Los resultados de la interacción se incluyen en categorías discriminadas desde A a F (Donde A tiene el puntaje más alto de probabilidad) (Tabla 4).

La identificación del (os) “prey” que establecían interacción proteína-proteína con el “bait” de análisis permitió la definición del SID (Selection Interaction Domain). Este dominio corresponde a la secuencia de aminoácidos específica del “prey” necesaria para su interacción con el “bait” (Anexo 3).

Tabla 4. Categorías de interacción entre proteínas - Global PBS.

	Nivel de Interacción
A	<i>Interacción de muy alta confiabilidad</i>
B	<i>Interacción de alta confiabilidad</i>
C	<i>Interacción de buena confiabilidad</i>
D	<i>Interacción de moderada confiabilidad</i>

7.2.2 Sistema de doble híbrido en células eucariotas - CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System

Teniendo en cuenta que los resultados del sistema de doble híbrido en levadura fueron realizados sobre ADNc de ovario de ratón, se buscó comprobar que la interacción se presentara también entre las proteínas ADAMTS19 y COL6A2 humanas.

El sistema de doble híbrido en células eucariotas *CheckMate* (Promega) es una herramienta para la detección de interacciones proteína-proteína. Los dominios modulares de algunos factores de transcripción forman la base para los sistemas

de doble híbrido. Estos dominios incluyen uno de unión a ADN, que interactúa con una región promotora específica y uno de activación de un factor de transcripción. En el Sistema CheckMate una proteína ("X") es fusionada al dominio de unión al ADN y una segunda proteína ("Y") al dominio de activación transcripcional. En este sistema, la interacción entre las proteínas "X" y "Y" resulta en la transcripción del gen reportero de luciferasa *firefly* (Fig 5).

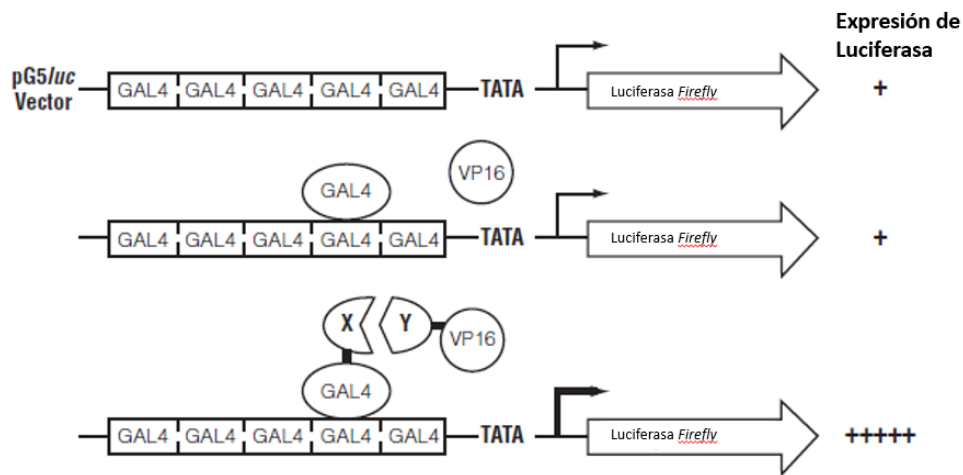


Figura 5. Representación esquemática del sistema CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System

El ADNc que codifica para las proteínas "X" y "Y" es clonado en los vectores pACT y pBIND. El vector pACT es un plásmido en el que un promotor para el citomegalovirus humano permite la expresión del dominio de activación del virus del herpes VP16 (aa 411- 456). Contiene una región de clonaje múltiple para la inserción del fragmento de ADNc de interés. Posee el gen de fosfotransferasa de neomicina que le confiere resistencia a análogos de la neomicina. Además, contiene un origen de replicación f1 para la producción de ADN de cadena simple y el gen de selección de β -lactamasa (Fig. 6).

El vector pBIND es un plásmido en el que un promotor para el citomegalovirus humano permite la expresión del dominio de unión al ADN (aa 1 – 147) sobre el promotor del gen de levadura GAL4. Posee una región de clonaje múltiple y el gen de la luciferasa de *Renilla*, cuya expresión permite normalizar las diferencias en la

eficiencia de la transfección. Además, un origen de replicación f1 para la producción de ADN de cadena simple y el gen de selección de β -lactamasa (Fig. 7).

El ADNc que codifica para dos proteínas que potencialmente interactúen se clona en los vectores pBIND y pACT para generar una fusión del dominio de unión a ADN de GAL4 y el dominio de activación de VP16. El vector pG5luc contiene cinco sitios de unión a GAL4 corriente arriba de la caja TATA (Fig. 8). Además, posee el gen reportero de luciferasa *firefly*. Las construcciones en los vectores pACT y pBIND se co-transfectan con el vector pG5luc. La expresión de Renilla luciferasa y *firefly* luciferasa se cuantifican usando el Dual-Luciferase® Reporter Assay System (DLR). La interacción entre las dos proteínas de interés da como resultado un aumento significativo en la expresión de *firefly* luciferasa en comparación con los controles negativos (SCHENBORN and BRONDYK 1998).

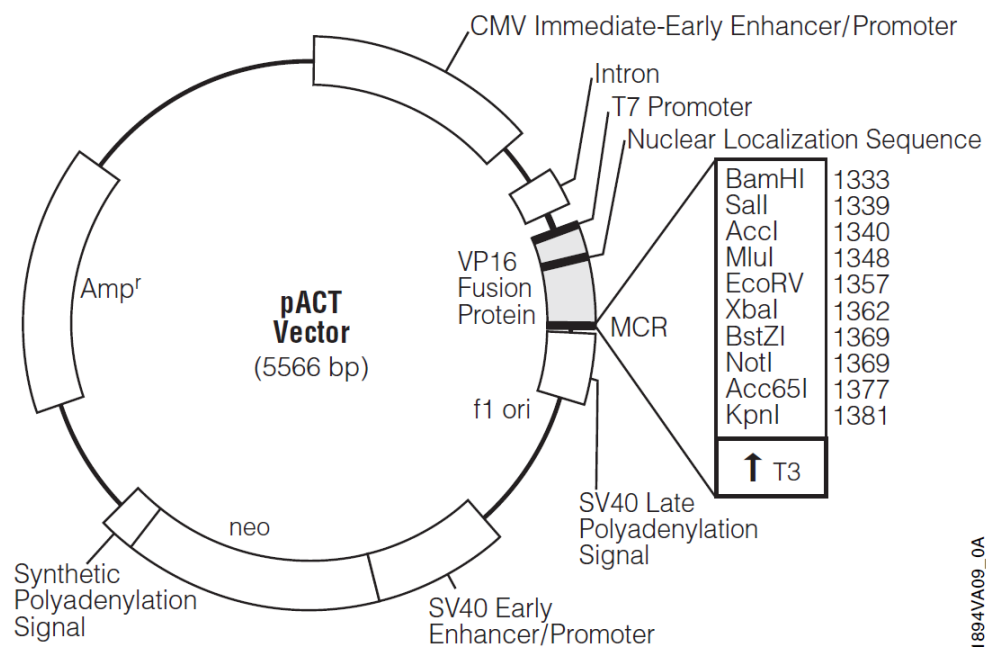


Figura 6. Mapa del vector pACT

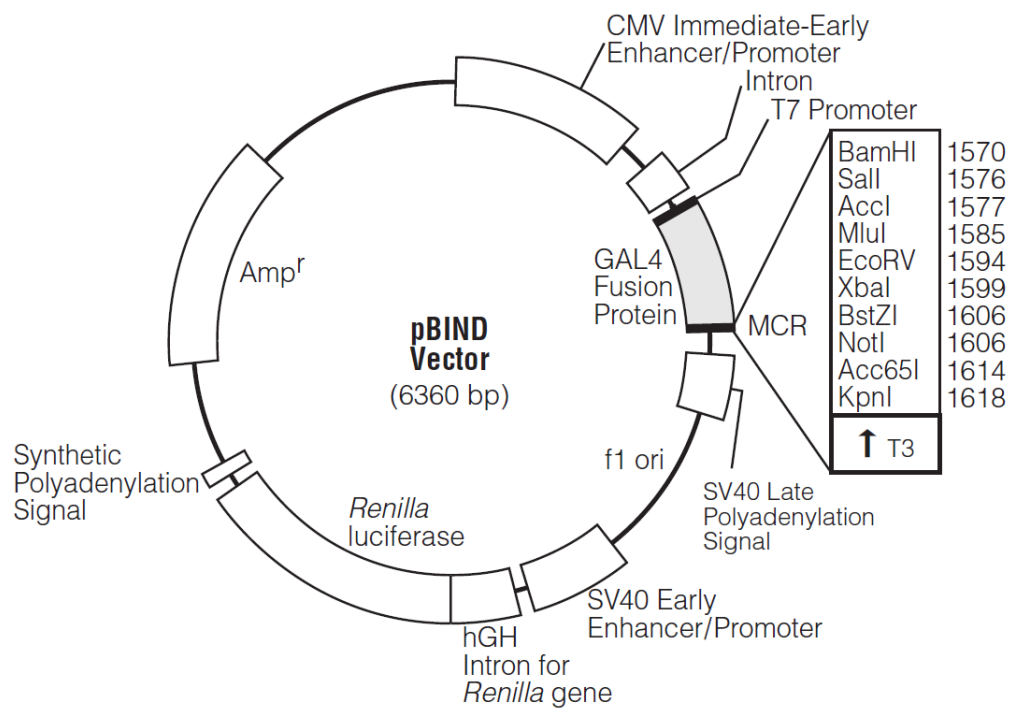


Figura 7. Mapa del Vector pBIND

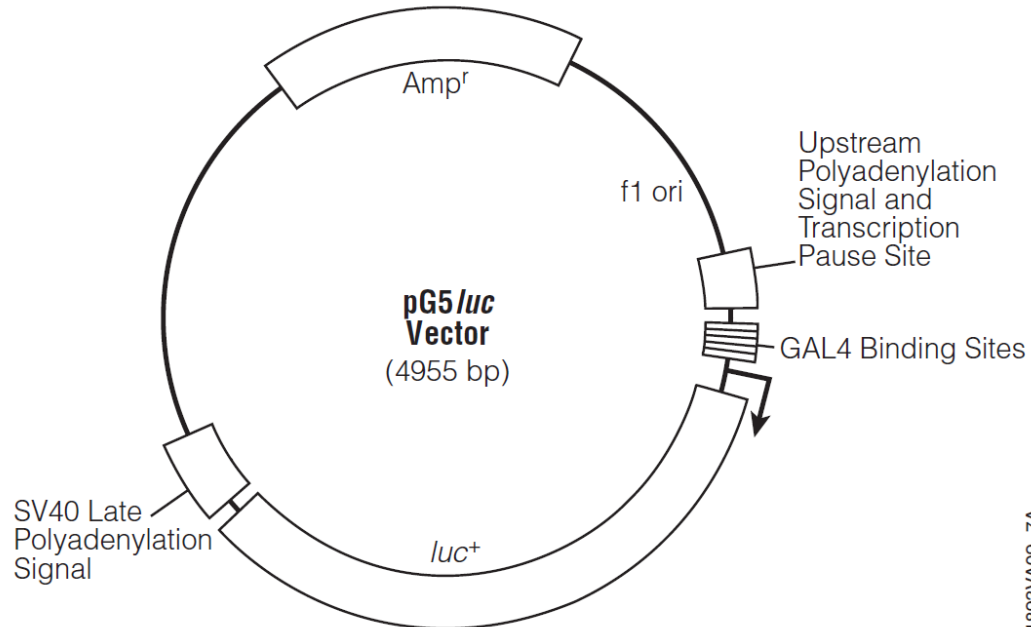


Figura 8. Mapa del vector pG5/luc

7.2.2.1 Construcciones plasmídicas para el clonaje del ADNc de *ADAMTS19* y *COL6A2* en pACT y pBIND

7.2.2.1.1 Clonaje de *ADAMTS19 wild type* en el vector pACT del sistema CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System

7.2.2.1.1.1 Generación del producto amplificado para la digestión con las enzimas de restricción Sall y NotI

La secuencia codificante completa del gen *ADAMTS19* (NM_133638) humano se encontraba clonada en el vector pCMV6-AC-GFP (OriGene). Se realizó una PCR sobre el vector pCMV6-AC-GFP/*ADAMTS19* con dos *primers* que incluían en sus extremos secuencias de reconocimiento para dos enzimas de restricción (Sall y NotI) presentes en el sitio de clonaje múltiple de los vectores pACT y pBIND (Tabla 5). El producto amplificado correspondía a un fragmento de 1608 pb. Este ADNc codificaba 536 aminoácidos de *ADAMTS19* (aa 633 hasta el aa 1169) e involucraba el sitio en que se encuentra la mutación en la paciente POF-7 (p.Thr943Ile).

La amplificación de las secuencias se comprobó en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X. Para la purificación del ADN amplificado por PCR se realizó un gel preparativo y la banda fue posteriormente extraída y purificada usando el kit PureLink® Quick Gel Extraction (Invitrogen).

Tabla 5. Primers de amplificación para *ADAMTS19*

Gen	Secuencia del <i>primer</i>	
<i>ADAMTS19</i>	Forward Hu-ADAMTS19Sall-fwCheck	5'ACGCGTCGACAA GCACCCGAGCACTTGGCTGGAGAG 3'
	Reverse Hu-ADAMTS19NotI-reCheck	5'ATAAGAATGCGGCCGCACTCTTCTGCT GTAGCTTTTGGGC 3'

7.2.2.1.1.2 Clonaje del ADNc de *ADAMTS19* en pCR4-TOPO

El fragmento de ADNc de *ADAMTS19* obtenido de la PCR de amplificación descrita anteriormente fue clonado usando el sistema TOPO-TA Cloning (Invitrogen). Para este clonaje se usan productos de PCR con extremos poliadenilados. La *taq* polimerasa tiene una actividad terminal no dependiente de la secuencia molde que incorpora el nucleótido deoxiaminidasa (A) al extremo 3' del producto de PCR. El vector linealizado pCR4-TOPO tiene un residuo deoxitimidina (T) en el extremo 3'. Esto permite que el producto de PCR se ligue de manera eficiente con el vector.

7.2.2.1.1.3 Transformación

Para la transformación del vector pCR4-TOPO con el inserto clonado, se utilizaron células de *Escherichia coli* quimio-competentes *One Shot TOP10 Competent Cells* (Invitrogen). Se añadieron 2µL del vector en 25µL de bacterias y se incubó por 30 minutos en hielo. Seguidamente, se realizó un choque térmico a 42°C en un baño serológico por 30 segundos y se conservaron en hielo por 5 minutos. Se agregó 125µL de medio S.O.C. y se incubó a 37°C en agitación por una hora. Se sembraron 100µL en placas de LB agar con ampicilina y se incubaron a 37°C toda la noche. Las colonias que crecieron en el medio corresponden a las células transformadas por el vector. Estas colonias fueron extraídas y añadidas en 5 ml LB Broth con ampicilina durante toda la noche en agitación a 37°C. Se extrajo el ADN plasmídico utilizando el protocolo PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit y se realizó una PCR de verificación con el primer forward T7 que se une al plásmido y un *primer* interno (reverse) que hibrida con un fragmento específico de *ADAMTS19*.

7.2.2.1.1.4 Digestión con enzimas de restricción

El ADN plasmídico con la inserción de la secuencia de *ADAMTS19 wild type*, con los sitios de restricción en 5' y 3', y el vector pACT se sometieron a un proceso de digestión con las enzimas de restricción Sall y NotI. En el NEBuffer 3.1 ambas enzimas presentan una actividad del 100% (*New England BioLabs*). Para la

reacción de digestión se adicionaron 1000 ng del producto, 0.2µL de BSA (100X), 5µL de NEBuffer 3.1 (10X), 1µL de NotI (10U), 0,5µL de Sall (20U) y agua para completar un volumen final de reacción de 40µL. Se incubó a 37°C por 4 horas. El producto final de digestión se pasó por un gel preparativo de agarosa (1%) y posteriormente se realizó la extracción de las bandas correspondientes con el kit *PureLink Quick Gel Extraction* (Invitrogen).

7.2.2.1.1.5 Ligación de *ADAMTS19 wild type* en el vector pACT

Para la ligación del fragmento amplificado de *ADAMTS19 wild type* en el vector pACT se empleó una T4 ligasa de ADN (Invitrogen). Esta ligasa es ampliamente utilizada para la generación de moléculas de ADN recombinante en las que fragmentos de ADN de interés se ligan al vector mediante enlaces covalentes. Se siguieron las condiciones especificadas en la Tabla 6. Teniendo en cuenta que el tamaño del vector es de 5566 pb y del inserto de 1608 pb se calculó la cantidad de ADN del inserto a partir de la siguiente fórmula:

$$ng \text{ Inserto} = \frac{100ng \times 1.6 \text{ kb}}{5.5 \text{ kb}} \times 3$$

$$ng \text{ Inserto} = 87.2 \text{ ng}$$

Tabla 6. Condiciones de la reacción de ligación

Condiciones de la reacción de ligación	
Buffer T4 ligasa	4µL
Relación molar Vector: Inserto	1:3
Inserto (15ng/µL)	5.8 µL
Vector (42.4ng/µL)	2.3 µL
T4 DNA ligasa (1U/µL)	3µL
Agua	6.1µL
Incubación toda la noche	16°C

Para transformar el producto de ligación se añadieron 3µL en 25µL de células de *Escherichia coli* quimio-competentes One Shot® TOP10 Competent Cells (Invitrogen). Las 23 colonias que crecieron en el medio sólido con Ampicilina fueron añadidas en 5 ml LB Base con Ampicilina durante toda la noche en agitación a 37°C. Se procedió a la amplificación del vector mediante PCR de colonias con un *primer forward* T7 EVV que se une al plásmido y un *primer* interno (reverse) que se hibrida con un fragmento específico de *ADAMTS19*. Esta PCR se realizó con el objetivo de verificar la adecuada ligación de fragmento en el vector pACT. Las construcciones plasmídicas fueron enviadas a secuenciación con primers internos y sobre el vector. Una vez comprobado que el inserto se hubiera clonado adecuadamente en los vectores se realizaron midipreps empleando el kit *PureLink® HiPure Plasmid Filter* y se conservaron a -20°C.

7.2.2.1.2 Clonaje de *ADAMTS19* mutante en el vector pACT del sistema CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System

7.2.2.1.2.1 Generación de la mutación c2828C>T de *ADAMTS19* mediante mutagénesis dirigida por PCR

La secuencia codificante completa del gen *ADAMTS19* (NM_133638) humano se encontraba clonada en el vector pCMV6-AC-GFP (OriGene). Para realizar la mutagénesis dirigida que permitiera posteriormente la creación de la construcción del plásmido pACT-*ADAMTS19*-MUT se siguió el protocolo descrito por Patel et al 2009, con algunas modificaciones. El método se basó en una PCR de extensión solapada, la cual comprendió dos rondas de PCR, generando dos fragmentos de ADN con extremos solapados. Los dos fragmentos fueron generados usando cuatro *primers* (dos flanqueantes y dos mutagénicos). Estos fragmentos fueron combinados en una reacción de fusión subsecuente en la que el extremo 3' solapado de cada hebra sirvió como *primer* de extensión para la hebra complementaria (PATEL et al. 2009). Los *primers* para la primera ronda de PCR

que generó los fragmentos A y B fueron diseñados para que la mutación se localizara en el centro del *primer* (Fig 9) (Tabla 7). El fragmento A correspondió a un producto amplificado de 2899 pb y en el fragmento B se amplificaron 800 pb. Para la PCR del fragmento A se utilizaron 12,5 μ l de *Platinum® Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen), 100 ng de ADN plasmídico (1 μ l), 2 μ l de cada uno de los *primers*, 1,5 μ l de DMSO y 8.25 μ l de H₂O para un volumen final de reacción de 25 μ l. Para amplificar el fragmento B se empleó *GoTaq Green Master Mix* (Promega) 12.5 μ l, 100 ng de ADN plasmídico (1 μ l), 2 μ l de cada uno de los *primers*, 1,5 μ l de DMSO y 8.25 μ l de H₂O para un volumen final de reacción de 25 μ l.

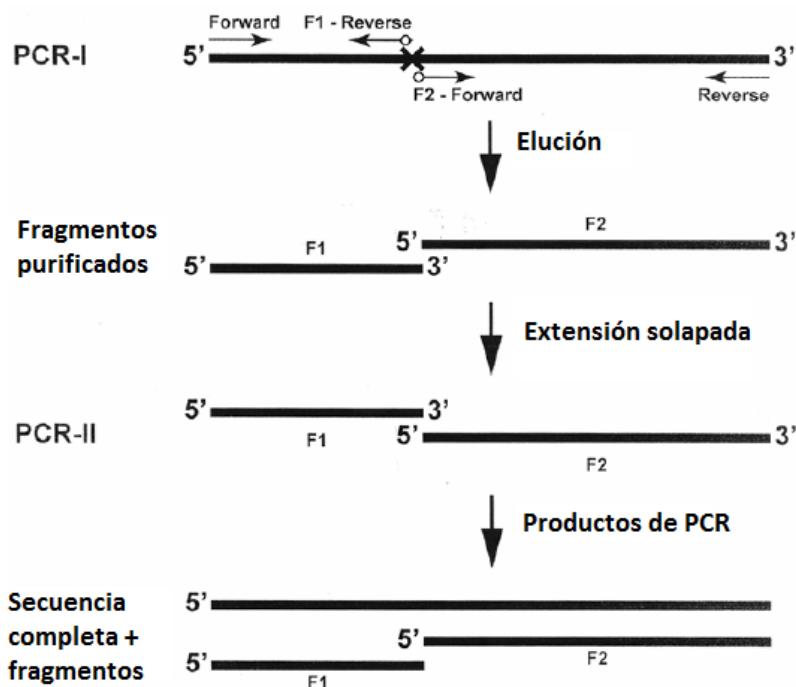


Figura 9. Esquema de mutagénesis dirigida, tomada y modificada de (PATEL et al. 2009)

Tabla 7. Primers para mutagénesis dirigida.

Gen	Secuencia del <i>primer</i>	
ADAMTS19 Fragmento A	Forward HuADAMTS19Alpha-2F	5'CCGGGAATTCGTCTCGACTGGATCCGGT3'
	Reverse HuADAMTS19-2828-1R	5'GACAACAGTGTCTCTGCACAAAAATCATG AGCAAAA3'
ADAMTS19 Fragmento B	Forward HuADAMTS19-2828-1F	5'GACAACAGTGTCTCTGCACAAAAATCATG AGCAAAA 3'
	Reverse HuADAMTS19Omega-1R	5' GGGACTTCTATGCCCAAAAGCTGC3'

Tabla 8. Programa del termociclador para la PCR para la amplificación del fragmento A del gen *ADAMTS19*

Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®		TIEMPO
Desnaturalización Inicial	94°C	2 minutos
Numero de ciclos	20 ciclos	
Desnaturalización	95°C	30 segundos
Anillamiento	57°C	30 segundos
Elongación	66°C	3 minutos
Elongación final	72°C	10 minutos
Conservación	4°C	

Tabla 9. Programa del termociclador para la PCR para la amplificación del fragmento B del gen *ADAMTS19*

Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®		TIEMPO
Desnaturalización Inicial	95°C	10 minutos
Numero de ciclos	20 ciclos	

Desnaturalización	95°C	40 segundos
Anillamiento	57°C	40 segundos
Elongación	72°C	40 segundos
Elongación final	72°C	10 minutos
Conservación	4°C	

Para la purificación del ADN amplificado por PCR se realizó un gel preparativo de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio seguido de electroforesis del producto amplificado. La banda fue extraída y purificada usando el kit PureLink® Quick Gel Extraction (Invitrogen).

Posteriormente, se realizó una segunda ronda de PCR en la que los fragmentos A y B purificados se mezclaron. La reacción se realizó con 12 µL del fragmento A, 3 µL del fragmento B, 10 µL de H₂O y 25 µL de *GoTaq Green Master Mix* (Promega). Las condiciones para la segunda ronda de PCR están descritas en la tabla 10. A continuación, se realizó la purificación de la secuencia completa de ADN de *ADAMTS19* mutado mediante un gel preparativo y extracción de la banda de interés. Este producto fue secuenciado para verificar la introducción de la mutación deseada en *ADAMTS19* (c.2828C>T).

Tabla 10. Programa del termociclador para la segunda ronda de PCR

Programa Termociclador: MJ		TIEMPO
Research PTC-100®		
Desnaturalización Inicial	94°C	2 minutos
Numero de ciclos	2 ciclos	
Desnaturalización	94°C	1 minuto
Anillamiento	47°C	1:30 minutos
Elongación	66°C	3:40 minutos
# Ciclos		2

	94°C	1 minuto
	49°C	1:30 minutos
	66°C	3:40 minutos
# Ciclos		2
	94°C	1 minuto
	51°C	1:30 minutos
	66°C	3:40 minutos
# Ciclos		2
	94°C	1 minuto
	51°C	1:30 minutos
	66°C	3:40 minutos
# Ciclos		4
	94°C	1 minuto
	55°C	1:30 minutos
	66°C	3:40 minutos
# Ciclos		4
	94°C	1 minuto
	57°C	1:30 minutos
	66°C	3:40 minutos
Elongación Final	72°C	5 minutos

7.2.2.1.2.2 Clonaje del ADNc de *ADAMTS19* en pCR-XL-TOPO

El fragmento de ADNc de *ADAMTS19* mutado obtenido mediante el protocolo de mutagénesis dirigida descrito anteriormente fue clonado usando el TOPO XL PCR *Cloning Kit* (Invitrogen). La reacción de clonaje se describe en la tabla 11.

Tabla 11. Clonaje en pCR-XL-TOPO

	Volumen
ADNc de <i>ADAMTS19</i> mutado	2 µL
<i>Salt Solution</i>	1 µL
Agua	2 µL
Vector pCR-XL-TOPO	1 µL
	Incubación a temperatura ambiente por 30 minutos

Para la transformación se añadieron 3µL del producto en 25µL de células de *Escherichia coli* quimio competentes *One Shot® TOP10 Competent Cells*. Crecieron 18 colonias en el medio sólido con kanamicina y fueron añadidas en 5 ml de LB Base con kanamicina durante toda la noche en agitación a 37°C. Se realizó una PCR de colonia con un *primer forward* T7 que se une al plásmido y un *primer* interno (reverse) que alinea con un fragmento específico de *ADAMTS19*. Posteriormente, a las construcciones plasmídicas positivas se les extrajo el ADN plasmídico utilizando el protocolo *PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit* y fueron enviadas a secuenciación con primers internos y sobre el vector.

7.2.2.1.2.3 Generación del amplicón de *ADAMTS19* mutante

Para la generación del producto amplificado de *ADAMTS19* mutante se realizó una PCR sobre el vector pCR-XL-TOPO que contenía el fragmento de ADNc de *ADAMTS19* mutante y se siguió la metodología descrita en el numeral 7.2.2.1.1.1. Posteriormente el fragmento de ADNc de *ADAMTS19* mutante obtenido de la PCR se clonó en pCR4-TOPO y se transformó siguiendo la metodología descrita en 7.2.2.1.1.3.

7.2.2.1.2.4 Clonaje del fragmento de *ADAMTS19* mutante en el vector pACT mediante digestión-ligación

Para los procesos de digestión del producto amplificado y ligación en el vector pACT se siguió la metodología descrita en 7.2.2.1.1.4 y 7.2.2.1.1.5, respectivamente.

7.2.2.1.3 Clonaje de *COL6A2 wild type* en el vector pBIND del sistema CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System

7.2.2.1.3.1 Generación del producto amplificado de *COL6A2* para la digestión con enzimas de restricción luego del clonaje.

Para la obtención de la región codificante de *COL6A2* humano, se realizó primero la extracción de ARN total de una muestra de tejido de piel almacenada en trizol, en la cual previamente se ha demostrado su expresión (VON KAISENBERG *et al.* 1998; SMILEY *et al.* 2005). A continuación, se obtuvo el ADNc utilizando el kit *superscript III first-strand synthesis system* (Invitrogen). Posteriormente, se amplificó el ADNc de *COL6A2* con dos *primers* que incluían en sus extremos secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción Sall (localización 5' del fragmento amplificado) y NotI (localización 3' del fragmento amplificado) (Tabla 12). El producto amplificado correspondía a un fragmento de 1332 pb. Este ADNc traducía para 444 aminoácidos de *COL6A2* (aa 256 hasta el aa 700) e involucraba la región donde se encontraba el SID reportada en el sistema de doble híbrido en levadura. En paralelo se amplificó el ADNc del gen *house keeping GADPH*.

La amplificación del ADN se comprobó en un gel de agarosa al 1% en un buffer TBE 1X. Para la purificación del ADN amplificado por PCR se realizó un gel preparativo y la banda fue posteriormente extraída y purificada usando el kit *PureLink® Quick Gel Extraction* (Invitrogen). Se procedió a la secuenciación con los mismos *primers* de amplificación.

Tabla 12. Primers de amplificación para COL6A2

Gen	Secuencia del <i>primer</i>	
COL6A2	Forward Hu-COL6A2Sall- Checkmate	5'ACGCGTCGAC AAGGAGAGAAGGGTGAATTTGGAGCCGA 3'
	Reverse Hu-COL6A2NotI- CheckMate	5'ATAAGAATGCGGCCGC CTGTCTCGGACTTGGGGTCCTTAG 3'

7.2.2.1.3.1 Clonaje del ADNc de COL6A2 en pCR4-TOPO y transformación

El fragmento de ADNc de COL6A2 amplificado fue clonado usando el sistema TOPO-TA Cloning (vector pCR4-TOPO) (Invitrogen). Para la transformación, se utilizaron células de *Escherichia coli* quimio-competentes *One Shot TOP10 Competent Cells* (Invitrogen). Crecieron 20 colonias en el medio con ampicilina que corresponden a las células transformadas por el vector. Estas colonias fueron añadidas en 5 ml LB Broth con ampicilina durante toda la noche. Se realizó una PCR de colonia con un *primer forward* T7 que se une al plásmido y un *primer* interno (reverse) que alinea con un fragmento específico de COL6A2. Posteriormente, a las construcciones plasmídicas positivas se les extrajo el ADN plasmídico utilizando el protocolo *PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit* y fueron enviadas a secuenciación con primers internos y sobre el vector.

7.2.2.1.3.2 Clonaje del fragmento de COL6A2 en el vector pBIND mediante digestión-ligación.

Para los procesos de digestión del producto amplificado y ligación en el vector pBIND se siguió la metodología descrita en 7.2.2.1.1.4 y 7.2.2.1.1.5, respectivamente.

7.2.2.2 Co-transfección de las construcciones plasmídicas

Un día antes de la transfección se sembraron 100.000 células COS-7 por pozo en cajas de 24 pozos, empleando la cámara de Neubauer para el conteo celular. Las células se encontraban aproximadamente a un 70% de confluencia al momento de la transfección.

Se co-transfectaron células empleando el lípido catiónico *FuGENE6 Transfection reagent* (Promega) agregando las siguientes cantidades de ADN de cada uno de los constructos:

- 200ng del constructo con el vector pACT
- 200 ng del constructo con el vector pBIND
- 200 ng del vector pG5/*luc*

Se siguieron las recomendaciones del protocolo de *CheckMate* de mantener una proporción de 1:1:1 para cada uno de los constructos en la transfección. Los constructos con los que se realizaron las co-transfecciones se describen en la tabla 13. Simultáneamente, en paralelo se co-transfectaron los vectores pACT-MyoD y pBIND-Id, controles positivos que codifican y expresan dos proteínas que interactúan *in vivo*. Las co-transfecciones se llevaron a cabo al menos tres veces en sextuplicado. Se calculó la cantidad de ADN (μg) y FuGENE (μl) necesarios para mantener una proporción de 1:3.

Tabla 13. Co-transfecciones realizadas

Transfección
pBIND/COL6A2 + pACTADAMTS19WT + pG5/ <i>luc</i>
pBIND/COL6A2 + pACTADAMTS19MUT + pG5/ <i>luc</i>

Para realizar la transfección se adicionó el medio OptiMEM (libre de SFB y antibiótico) y el FuGENE a cada tubo, se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. A continuación, se añadió la cantidad de ADN calculado para mantener la proporción descrita anteriormente. Se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 30 minutos para permitir la formación del complejo entre el lípido catiónico y el ADN. A cada caja de 24 pozos se le retiró el medio DMEM suplementado con suero fetal bovino y antibiótico y se reemplazó por 500µl OptiMEM. Posteriormente, se sembraron 125 µl de la mezcla de transfección en cada pozo. Se incubó a 37°C por 48 horas para permitir la expresión de las proteínas. Por último, se extrajo el medio OptiMEM y se realizó el lavado de los pozos con PBS. Se añadió 100µl del buffer de lisis 1X a cada pozo y la placa se llevó a agitación a 100 rpm a temperatura ambiente por una hora. Los lisados celulares se recuperaron por medio de desprendimiento manual y fueron transferidos a tubos de 1.5ml.

7.2.2.3 Dual-Luciferase Reporter Assay System

Se empleó el protocolo Dual Luciferase Reporter Assay System para cuantificar la cantidad de Renilla luciferasa y *firefly* luciferasa (Promega). Se añadieron 100µl del reactivo de ensayo de luciferasa II (LAR II) en cada uno de los tubos para lectura. Se transfirieron 20µl de lisado celular al tubo que contiene LAR II y se mezcló pipeteando 2 a 3 veces. Se realizó la lectura en un luminómetro GloMax® 20/20. Se registró la medición de la actividad de *firefly* luciferasa. Se retiró la muestra del luminómetro y se añadieron 100 µl del reactivo *Stop & Glo®*. Se mezcló suavemente y se volvió a colocar la muestra en el luminómetro para realizar la lectura. Se registró la actividad de Renilla luciferasa. Los resultados fueron reportados en unidades relativas de luciferasa (URL) y la significancia estadística fue estimada con la prueba t-Student.

8 Resultados

8.1 NGS

La secuenciación de siguiente generación produjo ~2.5 GB de datos a partir de las muestras de las 12 pacientes. Cerca del 90% de la secuencia de bases de interés fue cubierta superando el umbral establecido para la lectura adecuada de los polimorfismos de nucleótido único y los *indels* (deleciones e inserciones). Posteriormente se filtraron los datos de las variantes de secuencia identificando 5 variantes nuevas en estado heterocigoto. La verificación de los resultados del NGS fue realizada mediante secuenciación de Sanger. Se confirmaron 4 de las 5 variantes en las pacientes analizadas (tabla 14). El SNP en el gen *NR5A1* (c.1195G>T, p.Ala399Ser) correspondió a un artefacto de la NGS.

Tabla 14. Variantes encontradas en la NGS

Paciente	Variante	Proteína
POF-7	<i>ADAMTS19</i> c.2828C>T	p.Thr943Ile
POF-19	<i>LHCGR</i> c.296A>G, <i>BMP2R</i> c.2960C>T	p.Asn99Ser p.Ser987Phe
POF-23	<i>LHCGR</i> c.526C>T	p.Ser176Pro

En el trabajo de tesis desarrollado se efectuó únicamente el estudio de la variante de *ADAMTS19* c.2828C>T (Fig. 10).

POF7-ADAMTS19

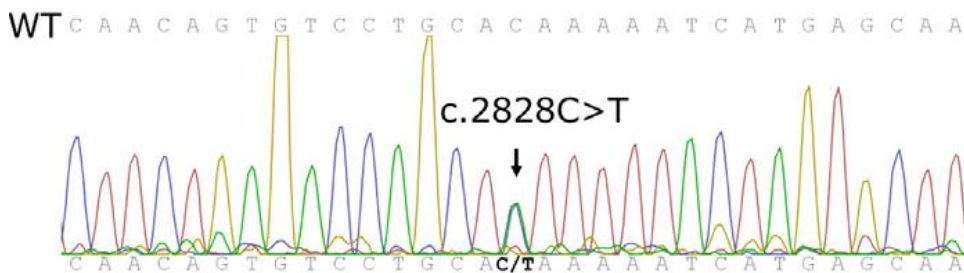


Figura 10. Cromatograma de secuenciación de Sanger de la paciente POF-7

8.2 Fenotipo de la paciente

La paciente POF-7 experimentó la menarquia a los 12 años de edad y presentó ciclos menstruales regulares (25 días) hasta la edad de 28 años. Posteriormente, tuvo ciclos irregulares por 1 año, evolucionando rápidamente a amenorrea. La ecografía transvaginal reportó útero y ovarios con características normales. Los niveles de FSH, LH y E₂ en plasma a los 29 años eran 96.2 IU/L, 58.1 IU/L, y 38 pg/mL, respectivamente (rango normal: FSH, 4–13 IU/L; LH, 2–15 IU/L; E₂, 20–145 pg/mL). No se detectaron anticuerpos anti-tiroideos y anti-ADN en suero. Además, la paciente no reportó historia familiar de infertilidad (tabla 15).

Tabla 15. Resumen de características clínicas y moleculares.

Características clínicas	
Edad actual	29 años
Amenorrea	Secundaria
FSH	96.2 IU/L
LH	58.1 IU/L
E ₂	38 pg/mL
Hallazgos moleculares	
Gen	<i>ADAMTS19</i>
Variación de secuencia	c.2828C>T
Cambio de Aminoácidos	p.Thr943Ile
Predicción <i>in silico</i>	
SIFT	0.32
PolyPhen2	Posiblemente deletéreo

8.3 Predicciones *in silico*

Las predicciones *in silico* de la patogenicidad de la variante de secuencia *ADAMTS19* c.2828C>T fueron realizadas con los programas bioinformáticos SIFT y PolyPhen2. Para SIFT El rango de puntuación oscila entre 0 a 1. La sustitución de aminoácidos se predice deletérea cuando la puntuación es < 0,05, y tolerada si

la puntuación es > 0,05. En el caso de la proteína en estudio el valor fue de 0.32. El resultado para PolypPhen2 nos indicó una proteína “posiblemente deletérea”.

8.4 Frecuencia alélica

Se realizó la amplificación del exón 19 de *ADAMTS19* en el grupo control y en el grupo de población general para determinar las frecuencias alélicas de la variante *ADAMTS19* c.2828C>T. Los resultados en el grupo control fueron 0/352 y en el grupo de población general de 0/690.

8.5 Sistema de Doble híbrido en levaduras

El ULTImate Y2H screen permitió identificar la interacción del fragmento de ADNc de Adamts19 de *Mus Musculus* con una región del ADNc de Col6a1 con un PBS categoría B y con una región del ADNc de Col6a2 con un PBS categoría A (Tabla 16) (Anexo 3).

Tabla 16. Resultados global PBS ULTImate Y2H SCREEN Mus musculus - Adamts19 vs Mouse Ovaries_RP1

Id. del clon	Tipo de secuencia	Nombre del gen	Inicio..Parada (nt)	Marco de lectura	PBS
pB66_A-17	5p/3p	Mus musculus - Col6a1	990..2011	IF	B
pB66_B-87	5p/3p	Mus musculus - Col6a1	1217..2131	OOF2	B
pB66_B-114	5p/3p	Mus musculus - Col6a1	1524..2042	IF	B
pB66_A-1	5p/3p	Mus musculus - Col6a1	1587..2038	IF	B
pB66_A-28	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	963..1992	IF	A
pB66_A-16	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	1053..2008	IF	A
pB66_A-39	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	1206..1981	IF	A
pB66_A-23	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	1236..1970	IF	A
pB66_A-15	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	1284..1992	IF	A
pB66_A-32	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	1329..2169	IF	A
pB66_B-26	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	1338..2010	IF	A
pB66_B-40	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	1338..2010	IF	A
pB66_B-70	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	1452..1991	IF	A
pB66_B-28	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	1524..2014	IF	A
pB66_A-33	5p/3p	Mus musculus - Col6a2	1698..1992	IF	A

8.6 Sistema de doble híbrido en células eucariotas - CheckMate™

Mammalian Two-Hybrid System

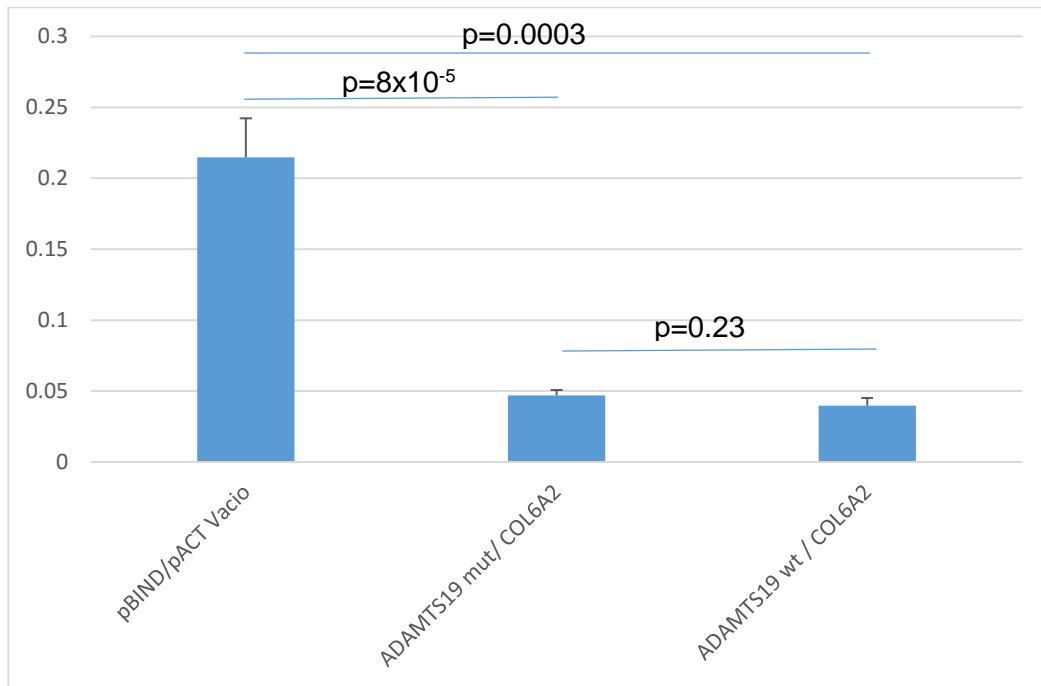


Figura 11. Resultados CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System.

Los resultados del ensayo de luciferasa para el sistema de doble híbrido en células eucariotas no permitieron replicar los resultados previos obtenidos mediante el sistema de doble híbrido en levadura ULTimate Y2H. Los valores de URL entre las células co-transfectadas con ADAMTS19mut/Col6A2 versus ADAMTS19wt/Col6A2 no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.23$) (Fig 11).

9 Discusión

El objetivo del presente trabajo de tesis se fundamentó en la búsqueda de mutaciones en genes candidatos de FOP mediante el uso de NGS. Las herramientas basadas en secuenciación de Sanger para la identificación de mutaciones en genes candidatos de FOP presentan múltiples limitaciones técnicas, de costo y de rendimiento. La secuenciación de Sanger tradicional solo puede leer aproximadamente 700pb por reacción. Por el contrario, la NGS es una técnica que provee un análisis más eficiente y a gran escala del genoma humano que permite la secuenciación en paralelo de millones de bases en una única reacción (LAISSUE 2015). Teniendo en cuenta que en los procesos fisiológicos relacionados con la fertilidad y la reproducción se encuentran implicadas múltiples redes de señalización molecular, un gran número de genes controlan la función reproductiva (MATZUK and LAMB 2008; MATZUK and BURNS 2012). Lo anterior conduce a una dificultad para la selección de los genes candidatos a secuenciar de manera tradicional que no se presenta con el uso de NGS.

Esta metodología de abordaje en las pacientes con FOP permitió, en el presente trabajo, identificar mutaciones que potencialmente contribuyen con el desarrollo de la patología en 3 de 12 pacientes.

La paciente POF-7 presentaba una mutación no sinónima en el gen *ADAMTS19* (c.2828C>T, p.Thr943Ile). Esta mutación no había sido descrita anteriormente en las bases de datos de SNP y no fue encontrada en los grupos control específicos y de la población general. Estos datos sugieren que la variante encontrada es rara. La FOP puede manifestarse a edades tempranas y limita la función reproductiva de la paciente por lo que el fenotipo y las potenciales variantes causales se encuentra sometidos a una selección negativa. Variantes asociadas a un fenotipo de FOP severo sufrirán esta selección y tendrían pocas posibilidades de alcanzar frecuencias elevadas en la población, por lo que en general serían variantes *de novo* o de origen reciente (REES *et al.* 2011; CARRERA CACHAZA 2012).

El análisis *in silico* de la mutación predijo un efecto deletéreo con PolyPhen2 y tolerada para SIFT. Ambas herramientas utilizan la homología de secuencias de proteínas para predecir si es probable que una sustitución de aminoácido sea perjudicial para la función de la proteína basado principalmente en el grado de conservación de la base afectada. En contraste a SIFT, que se basa únicamente en la homología de secuencia para la predicción, PolyPhen2 utiliza las anotaciones de UniProt para predecir si la sustitución de un aminoácido se produce dentro de un sitio estructural o funcional importante para la proteína, por ejemplo, sitios activos o de unión (RAMENSKY *et al.* 2002; FLANAGAN *et al.* 2010). La sensibilidad de SIFT es de 69% y su especificidad de 13%. PolyPhen2 tiene una sensibilidad de 68% y una especificidad de 16%. Estas herramientas bioinformáticas pueden ser útiles en la predicción de los cambios que puedan causar una pérdida de la función de las proteínas. Sin embargo, los resultados deben ser interpretados con cautela y las variantes patogénicas deben ser reportados idealmente en el contexto de otras evidencias científicas que den soporte a los hallazgos (FLANAGAN *et al.* 2010).

La mutación p.Thr943Ile se encuentra localizada en la primera repetición de trombospondina en la región C-terminal de la proteína. Se ha reportado que, la región C-terminal de proteínas ADAMTS es necesaria para la especificidad de sustrato y la localización subcelular (PORTER *et al.* 2005). El dominio TS reconoce al receptor CD36 (receptor *scavenger* de la familia B), el heparán sulfato, el colágeno V, la fibronectina, el TGF- β y otros glicosaminoglicanos. Las Trombospondinas tienen funciones en la inhibición de la angiogénesis mediante la unión al receptor CD36 que se encuentra en las células endoteliales. El dominio TS también participa en la adhesión celular y la motilidad celular además de la agregación célula-célula (RODRÍGUEZ VALBUENA 2014). Por lo tanto, hipotetizamos que esta mutación podría alterar las propiedades de unión al sustrato de la proteína ADAMTS19, modificar su selectividad enzimática y/o mostrar una localización subcelular anormal.

La función de ADAMTS19 es desconocida y está incluida dentro del grupo de “*Orphan ADAMTS*” denominadas de esta manera porque no se han descrito sus sustratos específicos. Para identificar las potenciales proteínas de interacción de ADAMTS19 se realizó un tamizaje de doble híbrido en levadura sobre una librería de ADNc de ovario de *Mus Musculus*. Esta librería se utilizó teniendo en cuenta que el ratón es el mamífero con mayor conservación funcional genética y proteómica con respecto al humano. En su genoma existe más de un 80% de genes que contienen ortólogos en humanos con una homología entre un 70% y un 100%. Igualmente, aproximadamente el 75% de las proteínas demuestra una expresión conservada (KISLINGER and GRAMOLINI 2010). Además, era la única librería de ovario disponible en *hybrigenics*.

En el sistema de doble híbrido en levadura pueden existir interacciones difícilmente detectables (e.g. poca representación del ARNm en la biblioteca, plegamiento de la proteína, toxicidad) o puede haber interacciones falsas positivos. El PBS se ajusta mediante la integración con resultados previos de la base de datos de *Hybrigenics* en la que se han encontrado interacciones positivas, para disminuir los falsos positivos (RAIN *et al.* 2001; FORMSTECHE *et al.* 2005).

Mediante el sistema de doble híbrido en levadura se identificó a Col6a2 y Col6a1 como proteínas que interactúan con Adamts19. Para comprobar la interacción entre las proteínas ADAMTS19 y COL6A2 humanas se empleó el sistema de doble híbrido en células eucariotas. Los resultados encontrados no permitieron replicar los resultados obtenidos previamente. Sin embargo, en estudios previos de tamizaje de doble híbrido en levadura para proteínas de *Drosophila melanogaster* se pudo comprobar posteriormente la interacción proteica en humanos para el 79% de las interacciones con alto grado de confianza (PBS A, B y C) utilizando las metodologías de coinmunoprecipitación o *pull-down* (FORMSTECHE *et al.* 2005).

En el caso de la interacción de las dos proteínas que estudiábamos se pudo presentar un resultado falso negativo en el sistema de doble híbrido de células

eucariotas. Esto podría explicarse porque los dominios que interactúan pueden ser enmascarados por las interacciones intramoleculares que no son accesibles a sus ligandos a menos que se expongan a una señal de activación específica. Esta señal de activación puede no estar presente debido a una inadecuada localización subcelular de la proteína de interés al momento del estudio (TERRADOT *et al.* 2004; FORMSTECHEER *et al.* 2005).

Los sistemas de tamizaje de doble híbrido presentan algunas limitaciones que deben ser superadas para que los resultados sean satisfactorios. Un *bait* adecuado combinado con un fragmento *prey* corto disminuyen significativamente la tasa de falsos negativos dentro de esta clase de proteínas (FROMONT-RACINE *et al.* 1997).

10 Perspectivas

Con la premisa de que la NGS es una poderosa herramienta para la identificación de nuevos genes involucrados en la FOP, se podría ampliar este estudio, tanto en el número de casos de FOP como el número de genes a secuenciar mediante esta técnica con el objetivo de identificar potenciales marcadores moleculares de uso clínico.

Para corroborar la interacción entre ADAMTS19 y COL6A2, se podrían utilizar otras técnicas que han sido validadas para el estudio de las interacciones proteína-proteína como la coimmunoprecipitación o el *pulldown*. Una vez comprobada esta interacción se podría validar si ésta también se presenta con la versión mutante de la proteína ADAMTS19 o si está alterada o ausente. Además, sería interesante crear un modelo *knock-out* de ratón *Adamts19* para el estudio de su fenotipo.

Partiendo de la hipótesis de que esta mutación podría alterar la localización subcelular de la proteína, se podrían utilizar técnicas que permitan determinar la localización subcelular de la proteína *Wild Type* y mutante (inmunofluorescencia, GFP), para comprobar si existe un cambio en esta localización. Esto es especialmente válido en el marco de una potencial retención intracelular antes de su normal secreción hacia la matriz extracelular, donde en principio debería ejercer su principal función.

11 Anexos

11.1 Anexo 1

Secuenciadores automáticos.

Sistemas PAGE:

ABI PRISM 377 de Applied Biosystems, el cual permite la utilización de cuatro fluoróforos diferentes por lo que es posible realizar las cuatro reacciones en un solo tubo y cargarlas en un solo carril de gel. Las longitudes del gel permiten leer entre 200 y 1000 pb (TOONEN and HUGHES 2001).

ALF express II ADN analysis system de Amersham Pharmacia Biotech, emplea cebadores marcados con un único fluoróforo para desarrollar cuatro reacciones independientes que se deben correr en cuatro carriles diferentes de gel.

Sistemas fundamentados en electroforesis capilar:

ABI PRISM 310 de Applied Biosystems, el primer sistema comercial de secuenciación mediante electroforesis capilar. La lectura de 500 pb con un 99% de precisión toma alrededor de 2 horas. Además, procesa secuencialmente 96 muestras (WATTS and MACBEATH 2001).

CEQ 2000 ADN analysis system de Beckman Coulter, sistema automatizado para secuenciar 8 muestras en paralelo. Secuencia hasta 96 muestras en 24 horas (GALVIN *et al.* 1998).

MegaBACE 1000 ADN Sequencing system de Molecular Dynamics, secuencia en paralelo 96 muestras en 2 horas. Sistema automatizado que secuencia hasta 1000 muestras en 24 horas sin intervención del usuario (DOLNIK 1999).

ABI PRISM 3700 de Applied Biosystems, cuenta con 96 capilares con hasta cuatro recargas automáticas de ellos. Cada reacción dura alrededor de 2 horas y 30 minutos y detecta un promedio de 550 bases por reacción de secuenciación (ADAMS *et al.* 2000).

11.2 Anexo 2

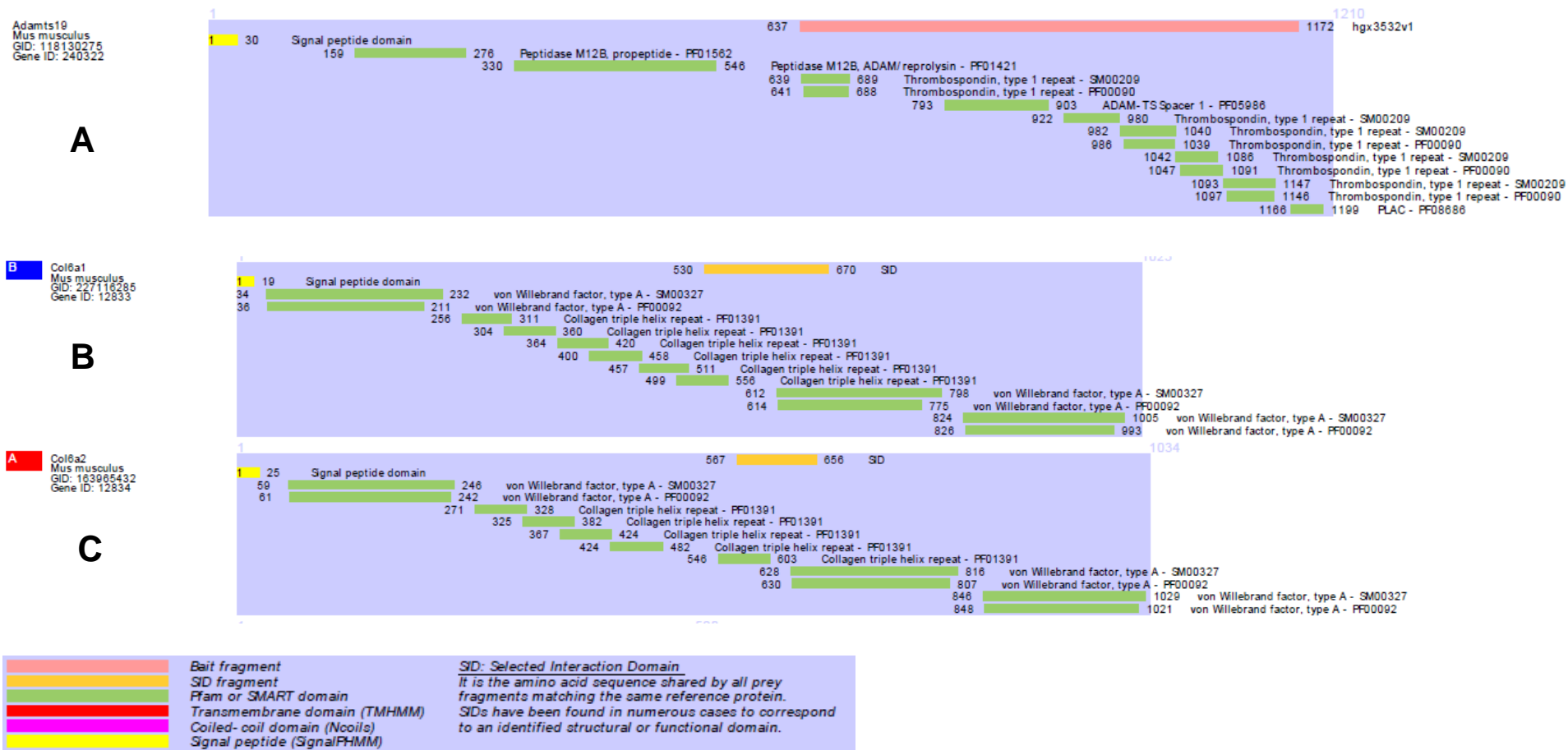
Genes Incluidos en el microarreglo de secuenciación.

ID Ensembl	Nombre del Gen
ENSG00000154734	ADAMTS1
ENSG00000145808	ADAMTS19
ENSG00000125378	BMP4
ENSG00000112175	BMP5
ENSG00000153162	BMP6
ENSG00000101144	BMP7
ENSG00000130385	BMP15
ENSG00000138696	BMPR1B
ENSG00000204217	BMPR2
ENSG00000111276	CDKN1B
ENSG00000164442	CITED2
ENSG00000137869	CYP19A1
ENSG00000100206	DMC1
ENSG00000091831	ESR1
ENSG00000140009	ESR2
ENSG00000183733	FIGLA
ENSG00000102081	FMR1
ENSG00000183770	FOXL2
ENSG00000118689	FOXO3
ENSG00000184481	FOXO4
ENSG00000131808	FSHB
ENSG00000170820	FSHR
ENSG00000134363	FST
ENSG00000174804	FZD4
ENSG00000164404	GDF9

ENSG00000152661	GJA1
ENSG00000187513	GJA4
ENSG00000147437	GNRH1
ENSG00000109163	GNRHR
ENSG00000123999	INHA
ENSG00000122641	INHBA
ENSG00000163083	INHBB
ENSG00000175189	INHBC
ENSG00000170498	KISS1
ENSG00000116014	KISS1R
ENSG00000157404	KIT
ENSG00000049130	KITLG
ENSG00000116678	LEPR
ENSG00000104826	LHB
ENSG00000138039	LHCGR
ENSG00000162624	LHX8
ENSG00000057468	MSH4
ENSG00000204410	MSH5
ENSG00000171487	NALP5
ENSG00000188425	NANOS2
ENSG00000187556	NANOS3
ENSG00000104320	NBN
ENSG00000106410	NOBOX
ENSG00000136931	NR5A1
ENSG00000167744	NTF4
ENSG00000082175	PGR
ENSG00000101856	PGRMC1
ENSG00000121879	PIK3CA

ENSG00000127948	POR
ENSG00000064835	POU1F1
ENSG00000204531	POU5F1
ENSG00000172179	PRL
ENSG00000113494	PRLR
ENSG00000175325	PROP1
ENSG00000171862	PTEN
ENSG00000125384	PTGER2
ENSG00000073756	PTGS2
ENSG00000163661	PTX3
ENSG00000169218	RSPO1
ENSG00000170365	SMAD1
ENSG00000175387	SMAD2
ENSG00000166949	SMAD3
ENSG00000113658	SMAD5
ENSG00000142168	SOD1
ENSG00000147465	STAR

11.3 Anexo 3



Resultados de ULTimate Y2H **A.** Región de Adamts19 utilizada por Hybrigenics para realizar el Y2H **B.** Regiones de Col6a1 que interactuaron con Adamts19 **C.** Regiones de Col6a2 que interactuaron con Adamts19

Imágenes de proporcionadas por Hybrigenics Services.

11.4 Anexo 4

Artículo: **Next generation sequencing in women affected by nonsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations.**

Dora Janeth Fonseca, Ph.D., Liliana Catherine Patiño, M.Sc., Yohjana Carolina Suárez, M.Sc., Asid de Jesús Rodríguez, M.Sc., Heidi Eliana Mateus, M.D., M.Sc., Karen Marcela Jiménez, M.Sc., Oscar Ortega-Recalde, M.D., M.Sc., Ivonne Díaz-Yamal, M.D., and Paul Laissue, M.D., Ph.D.

Fertil Steril. 2015 Jul;104(1):154-62

Next generation sequencing in women affected by nonsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations

Dora Janeth Fonseca, Ph.D.,^a Liliana Catherine Patiño, M.Sc.,^a Yohjana Carolina Suárez, M.Sc.,^a Asid de Jesús Rodríguez, M.Sc.,^a Heidi Eliana Mateus, M.D., M.Sc.,^a Karen Marcela Jiménez, M.Sc.,^a Oscar Ortega-Recalde, M.D., M.Sc.,^a Ivonne Díaz-Yamal, M.D.,^b and Paul Laissue, M.D., Ph.D.^a

^a Unidad de Genética, Grupo GENIUIROS, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario; and ^b Unidad de Fertilidad PMA, Clínica Marly, Bogotá, Colombia

Objective: To identify new molecular actors involved in nonsyndromic premature ovarian failure (POF) etiology.

Design: This is a retrospective case-control cohort study.

Setting: University research group and IVF medical center.

Patient(s): Twelve women affected by nonsyndromic POF. The control group included 176 women whose menopause had occurred after age 50 and had no antecedents regarding gynecological disease. A further 345 women from the same ethnic origin (general population group) were also recruited to assess allele frequency for potentially deleterious sequence variants.

Intervention(s): Next generation sequencing (NGS), Sanger sequencing, and bioinformatics analysis.

Main Outcome Measure(s): The complete coding regions of 70 candidate genes were massively sequenced, via NGS, in POF patients. Bioinformatics and genetics were used to confirm NGS results and to identify potential sequence variants related to the disease pathogenesis.

Result(s): We have identified mutations in two novel genes, *ADAMTS19* and *BMP2*, that are potentially related to POF origin. *LHCGR* mutations, which might have contributed to the phenotype, were also detected.

Conclusion(s): We thus recommend NGS as a powerful tool for identifying new molecular actors in POF and for future diagnostic/prognostic purposes. (Fertil Steril® 2015;■:■-■. ©2015 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Premature ovarian failure, POF, next generation sequencing, *ADAMTS19*, *BMP2*

Discuss: You can discuss this article with its authors and with other ASRM members at <http://fertilityforum.com/fonseca-ngs-pof-potential-genes/>



Use your smartphone to scan this QR code and connect to the discussion forum for this article now.*

* Download a free QR code scanner by searching for "QR scanner" in your smartphone's app store or app marketplace.

P rimary ovarian insufficiency is a heterogeneous pathology consisting of irregular ovulation secondary to distinct functional defects (1). This condition may evolve to pre-

mature ovarian failure (POF), a frequent condition characterized by the cessation of menses before age 40 and increased plasma gonadotropin levels (e.g., FSH >40 IU/L) (2). Women

with POF may have primary or secondary amenorrhea depending on whether the menarche has occurred (secondary) or not (primary) (3). Although most POF cases are considered idiopathic, distinct etiologies have been described, such as iatrogenic events, infectious agents, autoimmune conditions, environmental factors, and metabolic disorders. Most nonsyndromic POF cases that are considered idiopathic have pointed to the suspicion of a role for genetic and epigenetic etiological factors. Syndromic and nonsyndromic forms of POF have indeed been related to

Received February 28, 2015; revised April 7, 2015; accepted April 12, 2015.

D.J.F. has nothing to disclose. L.C.P. has nothing to disclose. Y.C.S. has nothing to disclose. A.d.J.R. has nothing to disclose. H.E.M. has nothing to disclose. K.M.J. has nothing to disclose. O.O.-R. has nothing to disclose. I.D.-Y. has nothing to disclose. P.L. has nothing to disclose.

D.J.F. and L.C.P. should be considered similar in author order.

This study was supported by the Universidad del Rosario (grant no. CS/ABN062/Genetics 015).

Reprint requests: Professor Paul Laissue, M.D., Ph.D., Unidad de Genética, Grupo GENIUIROS, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia (E-mail: paul.laissue@urosario.edu.co).

Fertility and Sterility® Vol. ■, No. ■, ■ 2015 0015-0282/\$36.00

Copyright ©2015 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.04.016>

differing types of X chromosome and autosomal anomalies. For instance, it has been postulated that the hypergonadotropic hypogonadism observed in individuals with Turner's syndrome is due to the haploinsufficiency of genes located on the critical regions of the X chromosome that escape genetic inactivation (4). Fragile X syndrome has been associated with *FMR1* premutations and *FMR2* microdeletions (5). X chromosome deletions and translocations have led to identifying loci on the X chromosome (POF1-POF2 and POF3) that are related to the disease pathogenesis (6 and references therein).

Considerable efforts have been made during the last 20 years to identify sequence variants mainly located in POF coherent candidate genes' coding regions. However, less than 50 mutations have been validated in only nine genes (*FSHR*, *LHCGR*, *NR5A1*, *NOBOX*, *FOXL2*, *FIGLA*, *BMP15*, *NANOS3*, and *STAG3*) via functional assays as causative of nonsyndromic POF (7–20). Such apparent failure to identify POF's molecular origin has been partly due to the fact that very few family-related cases allow gene mapping by linkage analysis. In fact, POF etiological mutations are under strong negative selection because they participate in the molecular process responsible for reproductive fitness. Moreover, ovarian development and physiology imply fine-tuned quantitative molecular events that are regulated by hundreds of genes, thereby hampering the selection of coherent candidates for direct sequencing. It should be noted here that, although Sanger sequencing has been widely used for studying POF candidate gene-coding regions, it does suffer from technical limitations as it only allows up to ~700 base pairs (bp) to be analyzed per reaction. Studying large candidate genomic regions is therefore especially challenging since it involves numerous assays in setting up polymerase chain reaction (PCR) and sequencing experimental conditions. The next generation sequencing (NGS) approach (first used in 2007) has been widely used as an efficient alternative for detecting novel monogenic disease-related genes (21–23). This technique has been used more recently for studying, simultaneously, coding regions of thousands of genes (e.g., exome sequencing) that participate in the pathophysiology of multigene complex diseases (24–27).

The present study involved, for the first time, performing NGS assays on women affected by nonsyndromic POF. The complete coding regions of 70 candidate genes were sequenced in 12 women affected by POF. Bioinformatics and genetic analysis led to identifying mutations in *ADAMTS19* and *BMPR2* that are potentially related to POF origin. *LHCGR* mutations that might have contributed to the phenotype were also detected. NGS would thus seem to be a powerful tool for identifying new molecular actors involved in POF and for diagnostic/prognostic purposes.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Controls

Patients and controls were of Colombian origin. They were attending the Clínica Marly's PMA Fertility Unit (Bogotá, Colombia) and/or the Genetics Unit at the Universidad del Rosario (Bogotá, Colombia). Twelve POF-affected women (POF3,

-4, -7, -9, -10, -11, -13, -17, -19, -23, and -136) were included in the present study. All had at least 6 months of amenorrhea before age 40, high FSH plasma levels (>40 IU/mL), and a normal 46,XX karyotype. Women having a background of anticancer treatment, pelvic surgery, ovarian infection, and/or autoimmune disease were excluded from the study.

The control group (CG) included 176 women whose menopause had occurred after age 50 and had no antecedents regarding gynecological disease. These individuals reported having had regular menstrual cycles during their reproductive life spans and having had at least one child. A further 345 women (general population group [GP]; ages ranging from 19 to 63) from the same ethnic origin were also recruited to assess allele frequency for potentially deleterious alleles. Depending on availability, DNA samples were collected from family members of patients affected by potential pathogenic variants. These samples were used for studying candidate sequence variants potentially segregating with the phenotype. All of this study's clinical and experimental steps were approved by the Institutional Ethics Committee of both participating institutions. All individuals signed a written informed consent form.

NGS and Bioinformatics Analysis

Human genome sequences (Build Hg19) for the coding regions of the 70 genes of interest were retrieved from the UCSC Genome Browser (Table 1). These genes were selected after exploring public Internet databases, such as PubMed, Highwire, Geoprofiles, and MGI (Jackson Laboratory). For Internet exploration of the literature we included keywords, such as "genetics of sex determination," "genetics of folliculogenesis," "genetics of ovulation," "gene expression and ovary," "ovary and transcriptomics," "mouse models of premature ovarian failure," "premature ovarian failure," "premature ovarian failure genetics," and "primary ovarian insufficiency." In addition, we revised previous reports on gene sequencing involving women with POF to identify those displaying positive functional tests. The MGI database was used to specifically explore the POF phenotype. The Geoprofiles tool of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) was used to evaluate expression patterns of selected genes.

Around 168,118 bases in length transcript sequences were flanked by 100 bp in the upstream and downstream regions, resulting in 247 kb target sequences. The 602 target coordinates were generated by merging the overlapping 706 exon coordinates in the selected genes' coding regions. These target sequences were masked for 3 kb length repeats, and a final set of 244 Kb sequences was considered for array design. Dense tiling of the target sequences was done to generate 60mer oligos regarding sense orientation. A final set of 241,399 probes was designed to fit into Agilent's 1X244K array, consisting of 241,399 experimental features and 2,105 control features. Total genomic DNA was isolated from leukocytes by use of the standard phenol/chloroform procedure. The DNA from the 12 POF samples was prepared and used for genome capture, as described elsewhere (28, 29). An Illumina GAI sequencer was used for high-throughput sequencing. The human

TABLE 1

Genes included in the sequencing microarray.

Ensembl ID	Gene name	Description
ENSG00000154734	ADAMTS1	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1 precursor
ENSG00000145808	ADAMTS19	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 19 precursor
ENSG00000125378	BMP4	Bone morphogenetic protein 4 precursor
ENSG00000112175	BMP5	Bone morphogenetic protein 5 precursor
ENSG00000153162	BMP6	Bone morphogenetic protein 6 precursor
ENSG00000101144	BMP7	Bone morphogenetic protein 7 precursor
ENSG00000130385	BMP15	Bone morphogenetic protein 15 precursor
ENSG00000138696	BMPR1B	Bone morphogenetic protein receptor type-1B precursor
ENSG00000204217	BMPR2	Bone morphogenetic protein receptor type-2 precursor
ENSG00000111276	CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
ENSG00000164442	CITED2	Cbp/p300-interacting transactivator 2
ENSG00000137869	CYP19A1	Cytochrome P450 19A1
ENSG00000100206	DMC1	Meiotic recombination protein DMC1/LIM15 homolog
ENSG00000091831	ESR1	Estrogen receptor
ENSG00000140009	ESR2	Estrogen receptor beta
ENSG00000183733	FIGLA	Factor in the germline alpha
ENSG00000102081	FMR1	Fragile X mental retardation 1 protein
ENSG00000183770	FOXL2	Forkhead box protein L2
ENSG00000118689	FOXO3	Forkhead box protein O3
ENSG00000184481	FOXO4	Forkhead box protein O4
ENSG00000131808	FSHB	Follitropin subunit beta precursor
ENSG00000170820	FSHR	Follicle-stimulating hormone receptor precursor
ENSG00000134363	FST	Follistatin precursor
ENSG00000174804	FZD4	Frizzled-4 precursor
ENSG00000164404	GDF9	Growth/differentiation factor 9 precursor
ENSG00000152661	GJA1	Gap junction alpha-1 protein
ENSG00000187513	GJA4	Gap junction alpha-4 protein
ENSG00000147437	GNRH1	Progonadoliberin-1 precursor
ENSG00000109163	GNRHR	Gonadotropin-releasing hormone receptor
ENSG00000123999	INH1A	Inhibin alpha chain precursor
ENSG00000122641	INH1B	Inhibin beta A chain precursor
ENSG00000163083	INH1B	Inhibin beta B chain precursor
ENSG00000175189	INH1C	Inhibin beta C chain precursor
ENSG00000170498	KISS1	Metastasis-suppressor KiSS-1 precursor
ENSG00000116014	KISS1R	KiSS-1 receptor
ENSG00000157404	KIT	Mast/stem cell growth factor receptor precursor
ENSG00000049130	KITLG	Kit ligand precursor
ENSG00000116678	LEPR	Leptin receptor precursor
ENSG00000104826	LHB	Lutropin subunit beta precursor
ENSG00000138039	LHCGR	Lutropin-choriogonadotropic hormone receptor precursor
ENSG00000162624	LHX8	LIM/homeobox protein Lhx8
ENSG00000057468	MSH4	MutS protein homolog 4
ENSG00000204410	MSH5	MutS protein homolog 5
ENSG00000171487	NALP5	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 5
ENSG00000188425	NANOS2	Nanos homolog 2
ENSG00000187556	NANOS3	Nanos homolog 3
ENSG00000104320	NBN	Nibrin
ENSG00000106410	NOBOX	NOBOX_HUMAN Isoform 2
ENSG00000136931	NR5A1	Steroidogenic factor 1
ENSG00000167744	NTF4	Neurotrophin-4 precursor
ENSG00000082175	PGR	Progesterone receptor (PR)
ENSG00000101856	PGRMC1	Membrane-associated progesterone receptor component 1
ENSG00000121879	PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform
ENSG00000127948	POR	NADPH-cytochrome P450 reductase
ENSG00000064835	POU1F1	Pituitary-specific positive transcription factor 1
ENSG00000204531	POU5F1	POU domain, class 5, transcription factor 1
ENSG00000172179	PRL	Prolactin precursor
ENSG00000113494	PRLR	Prolactin receptor precursor
ENSG00000175325	PROP1	Homeobox protein prophet of Pit-1
ENSG00000171862	PTEN	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase
ENSG00000125384	PTGER2	Prostaglandin E ₂ receptor EP2 subtype
ENSG00000073756	PTGS2	Prostaglandin G/H synthase 2 precursor
ENSG00000163661	PTX3	Pentraxin-related protein PTX3 precursor
ENSG00000169218	RSPD1	R-spondin-1 precursor
ENSG00000170365	SMAD1	Mothers against decapentaplegic homolog 1
ENSG00000175387	SMAD2	Mothers against decapentaplegic homolog 2

Fonseca. NGS and potential new POF genes. Fertil Steril 2015.

TABLE 1

Continued.

Ensembl ID	Gene name	Description
ENSG00000166949	<i>SMAD3</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 3
ENSG00000113658	<i>SMAD5</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 5
ENSG00000142168	<i>SOD1</i>	Superoxide dismutase
ENSG00000147465	<i>STAR</i>	Steroidogenic acute regulatory protein, mitochondrial precursor

Note: Ensembl ID refers to the genomic sequence code from the Ensembl database (<http://www.ensembl.org>).

Forseca. NGS and potential new POF genes. Fertil Steril 2015.

reference genome GRCh37/hg19 was used for mapping exome sequencing (Exome-Seq). The sequence database downloaded from the ensembl website (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index) was used as our gene model and for determining amino acid substitutions. Raw data obtained from Illumina GAI and SeqQC (in-house tool) were used for checking data quality. Low quality and adaptor contamination were filtered using BLAT software (in-house tool). The high-quality filtered data were further aligned with the human reference genome using BWA 0.5.9rc1 software (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>), and variants were identified using samtools-0.1.7a (<http://samtools.sourceforge.net/>). The variants were then filtered on the basis of read depth and mapping quality. The filtered variations were annotated, along with their potential effect, by using snpEFF 3.4i software (<http://snpeff.sourceforge.net/>). The results were compared with dbSNP database data (NCBI version db137). This led to identifying novel variations and their effect. Annotated variations were further reviewed manually. Genotypic Technology did the exome sequencing and primary data analysis. Excel functions were used for subsequent filtering.

ADAMTS19 (gi|112789555), BMPR2 (gi|15451916), and LHCGR (gi|106067657) human wild type sequences were used for multiple protein alignment (ClustalW software) for studying conservation during the evolution of interchanged residues (candidate mutations). These sequences were aligned with those from distinct vertebrate species (Supplemental Table 1).

PolyPhen2 and SIFT bioinformatics tools were used for assessing potentially damaging effects. PolyPhen2 prediction values resulted from an algorithm using comparative analysis of protein sequences from different species, the exchanged amino acids physicochemical characteristics, and mapping residue replacement regarding available three-dimensional structures. The results are assessed as benign, probably damaging, or possibly damaging (30). The SIFT program uses amino acid hydrophobic features and conservation among species (protein sequence similarity) to establish the probability of deleterious effects caused by missense mutations (31). A score under 0.05 would argue in favor of pathogenicity.

Sanger Sequencing

ADAMTS19 (ENST00000274487) exon 19, BMPR2 (ENST00000374580) exon 13, and LHCGR (ENST00000294954) exons 3 and 6 were amplified by PCR from relevant patients to confirm potentially deleterious candidate sequence variants obtained from NGS assays (see below and Table 2)

by using exon-flanking primers. Amplicons were purified using shrimp alkaline phosphatase and exonuclease I, following the manufacturer's instructions. Direct sequencing was performed with internal primers using a capillary sequencer (Applied Biosystems). Primer sequences and PCR conditions are available upon request. An identical experimental setup was used for screening these sequence variants in control individuals and in the GP group. Familial segregation of BMPR2 and LHCGR mutations found in the POF19 patient was screened in some members of her family (II:1, II:2, II:3, III:3, from Supplemental Fig. 1).

RESULTS

NGS and in Silico Analysis

NGS assays produced ~2.5 GB data for 12 samples for each individual as pair-end reads, having up to 97 bp mean read length, and about 90% (0.2 Mb length) of the targeted bases were covered, thereby sufficiently passing our thresholds for calling single nucleotide polymorphisms (SNPs) and short insertions or deletions (indels). Excel filtering of sequence variants revealed five heterozygous coding variants: ADAMTS19 c.2828C→T (p.Thr943Ile), LHCGR c.296A→G (p.Asn99Ser), LHCGR c.526C→T (p.Ser176Pro), BMPR2 c.2960C→T (p.Ser987Phe), and NR5A1 c.1195G→T (p.Ala399Ser).

The POF7 patient had the ADAMTS19-Thr943Ile mutation, the POF19 patient had LHCGR-Asn99Ser and BMPR2-Ser987Phe mutations, and the POF23 and POF136 women were carriers of the LHCGR-Ser176Pro and NR5A1-Ala399Ser mutations, respectively.

Multiple protein alignment showed that all interchanged amino acids were conserved among vertebrate species (data not shown). SIFT and PolyPhen predictions have been included in Table 2.

Direct Sequencing of Candidate Mutations

The confirmation step for NGS results (via Sanger sequencing) revealed that four out of five variants (ADAMTS19 c.2828C→T, LHCGR c.296A→G, LHCGR c.526C→T, and BMPR2 c.2960C→T) were definitely present in the corresponding patients (Fig. 1 and Table 2). The NR5A1 c.1195G→T sequence variant was not present in the POF136 patient, thus displaying an NGS artifact. The aforementioned positive variants were not found in the CG and GP groups. Therefore, the allele frequency for each variant was as follows: POF group, 1/24; CG, 0/352; GP group,

TABLE 2

Clinical features and molecular findings.			
Patient	POF7	POF19	POF23
Clinical features			
Actual age	29	36	30
Amenorrhea	Secondary	Secondary	Secondary
FSH, IU/L	96.2	130	90.4
LH, IU/L	58.1	19.6	20.8
E ₂ pg/mL	38	9.8	16
Molecular findings			
Gene	<i>ADAMTS19</i>	<i>BMPR2</i> <i>LHCGR</i>	<i>LHCGR</i>
Sequence variation	c.2828C>T	<i>BMPR2</i> -c.2960C>T <i>LHCGR</i> -c.296A>G	c.526T>C
AA change	Thr943Ile	<i>BMPR2</i> -Ser987Phe <i>LHCGR</i> -Asn99Ser	Ser176Pro
Pathogenicity prediction			
SIFT	0,32	<i>BMPR2</i> -Ser987Phe: 0,00 <i>LHCGR</i> -Asn99Ser: 0,26	0,03
PolyPhen	Possibly damaging	<i>BMPR2</i> -Ser987Phe: Possibly damaging <i>LHCGR</i> -Asn99Ser: Bening	Bening
Note: Clinical features include details on reproductive conditions of POF patients presenting potential pathogenic mutations. Molecular and in silico results suggest deleterious effects of missense mutations. AA = amino acid.			
Fonseca. NGS and potential new POF genes. Fertil Steril 2015.			

0/690. Family members of POF19 patient were carriers of the *BMPR2* c.2960A→G (II:3, III:3) or *LHCGR* c.296A→G (II:1, II:2) sequence variant. Only the POF19 individual (III:5) displayed both variants at the heterozygous state (Supplemental Fig. 1).

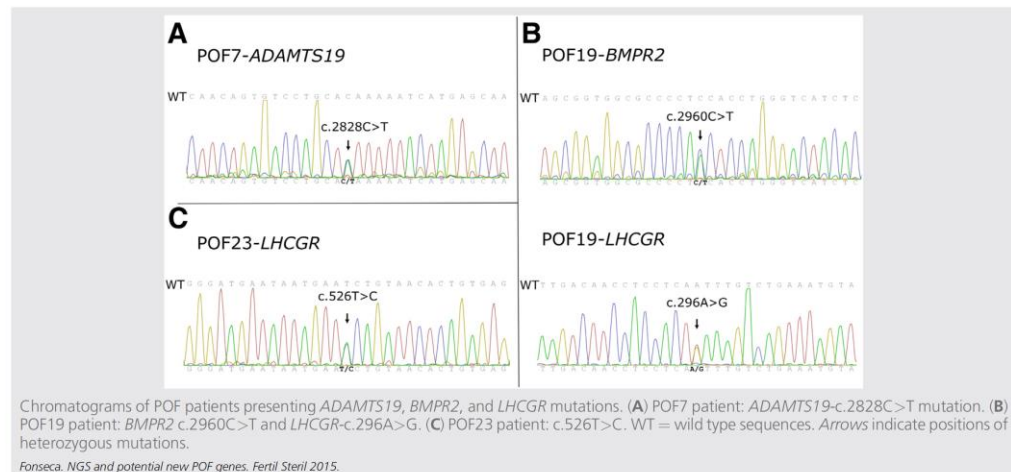
Patients' Phenotype

ADAMTS19- p.Thr943Ile mutation. The POF7 woman had experienced menarche at 12 years of age and had normal menstrual cycles (25 days) until the age of 28. Then she had

irregular cycles for 1 year, rapidly evolving to amenorrhea. Transvaginal ultrasound reported normal uterus and ovaries. FSH, LH, and E₂ plasma levels at 29 years of age were, respectively, 96.2 IU/L, 58.1 IU/L, and 38 pg/mL (normal ranges: FSH, 4–13 IU/L; LH, 2–15 IU/L; E₂, 20–145 pg/mL). Antithyroid and anti-DNA serum antibodies were undetectable. She did not refer to a family background of fertility disorders.

BMPR2-Ser987Phe and LHCGR-Asn99Ser mutations. The POF19 patient was a 37-year-old woman who was affected by amenorrhea, hot flushes, and dizziness. Menarche had occurred at 11 years of age with regular menstrual cycles

FIGURE 1



(every 28 days). When the menses stopped, her FSH, LH and E₂ levels were, respectively, 130 IU/L, 19.6 IU/L, and 9.8 pg/mL. Antithyroid and anti-DNA serum antibodies were undetectable. She did not mention symptoms evoking cardiac or pulmonary dysfunction. Physical examination did not reveal any clinical signs of pulmonary hypertension. Chest radiograph and transthoracic echocardiogram gave normal results. No family background of hypofertility or further diseases was recorded.

LHCGR-p.Ser176Pro mutation. The patient carrying the LHCGR-p.Ser176Pro was a 30-year-old woman who presented with secondary amenorrhea. She had experienced menarche at the age of 12, with irregular menstrual cycles. However, she did become pregnant and had one child. She had no family background of reproductive disease. Transvaginal ultrasound did not reveal any morphological abnormalities of the reproductive tract. Paraclinical tests showed increased FSH plasma levels (90.4 IU/L), as well as low LH (20.8 IU/L) and E₂ levels (16 pg/mL). Antithyroid and anti-DNA serum antibodies were undetectable.

DISCUSSION

Human infertility can be considered to be a public health concern since up to 15% of couples are affected by this disorder. Distinct conditions, such as tubal dysfunction, endometriosis, and ovarian pathology, have been recorded as exclusively female etiological factors. It has been estimated that ~15% of women have dysfunctions leading to reduced ovarian reserve and, eventually, to POF (32). To date, mutations in only a few genes have been definitely related to POF pathogenesis, owing to Sanger sequencing's technical limitations regarding the polygenic nature of reproductive phenotypes.

To overcome such drawbacks in the present study, the complete coding regions of 70 candidate genes were massively sequenced, via NGS, in 12 patients with POF (Table 1). Several characteristics were considered when including specific genes in the sequencing microarray, such as previous reported tests validating a functional role, coherent spatiotemporal expression pattern, positive genetic association studies, and animal models having similar to POF phenotypes. These genes belong to molecular pathways that are involved in distinct steps regarding gonad development and ovarian physiology, such as sex determination, meiosis, folliculogenesis, and ovulation. It should be noted that, since we used a 244K microarray, our approach probably did not encompass all POF candidate genes (e.g., more than 350) (33–37). However, our results indicated that 25% (3/12) of patients (POF7, POF19, and POF23) carried mutations that potentially contribute to disease pathogenesis.

The POF7 patient, who was affected by secondary amenorrhea, was a carrier of the *ADAMTS19*-c.2828C→T heterozygous sequence variant (Fig. 1). Human *ADAMTS19*, which is located on chromosome 5, encodes a zinc metalloprotease from the 19-member ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase having thrombospondin motifs) family of proteins (38). At the structural level, ADAMTS factors have distinct domains, motifs, and modules (38–40). These include (from the

N-ter to the C-Ter regions) a signal peptide, a prodomain, a metalloproteinase domain, a disintegrin-like domain, a central thrombospondin type I-like (TS) repeat, a cysteine-rich domain, a spacer region, and a C-terminal region having a variable number of TS repeats (39). ADAMTS19, like other members of the family, includes an additional region, the PLAC (protease and lacunin) domain, located in the protein's C-terminal region. It has been shown (by phylogenetic analysis) that ADAMTS17 is the closest related member to ADAMTS19 (38, 39, 41).

Although specific *ADAMTS19* expression has not been widely studied, it has been detected in an osteosarcoma cDNA library and in fetal lung (38). Low expression signals have been reported in developing heart, kidney, skeletal muscle, and testis (42, 43). *Adamts19* expression in mouse XX gonads has been observed at E10.5 and from E12.5 to E15.5 as well as in postnatal life (8 days postpartum) (42, 44). It is interesting that ovarian somatic cells expressing specific markers (e.g., *Follistatin* and *Foxl2*) also express *Adamts19* (42, 43). ADAMTS19's function remains unknown, but, similar to other family members, it might contribute to extracellular matrix remodeling by proteolytic activity on specific substrates, such as proteoglycans and fibrillar collagens (45). Concerning POF, it has been reported (using genome-wide SNP genotyping) that *ADAMTS19* might be associated with the phenotype (46). Furthermore, some *ADAMTS19* sequence variants seem to be associated with *ACVR2B* and *IGF2R* SNPs, which might confer increased susceptibility to POF (47, 48).

The *ADAMTS19* mutation (c.2828C→T, p.Thr943Ile mutation) found in our patient is novel, since it has not been described in public SNP databases and it was not present in 176 women from the CG. Furthermore, we could not find it in 345 women (690 alleles) from the GP, suggesting that it might be a rare causative variant. In silico analysis at the protein level showed that the interchanged threonine residue in position 943 was highly conserved among vertebrate species, thereby underlining a putative functional role. Regarding physicochemical properties, the presence of an isoleucine instead of a threonine is predicted to modify protein structure and hydrophobicity. In fact, Thr is a small, polar amino acid having hydrophilic properties, while Ile is a large, nonpolar hydrophobic residue. Such differences might alter protein folding and its function. Accordingly, PolyPhen2 predicted a deleterious effect ("possibly damaging" score). SIFT did not suggest a pathogenic consequence (score, 0.32), and it should be stressed that both PolyPhen2 and SIFT bioinformatics tools estimate only predictions regarding missense variants' potentially deleterious effects. PolyPhen2 and SIFT involve using some similar features, such as alignments methods, to propose potential deleterious effects. However, they automatically explore distinct Internet databases containing differing quality sequences for a specific protein. This leads, in some cases, to contradictory results, as well as to imprecise predictions. For instance, if, for a specific protein, a significant number of noncurated sequences (background noise) from other species are taken for analysis, it is highly probable that negative (harmless) predictions will be obtained for a particular missense mutation. On the contrary, if only a

few well-described sequences from closely related species (e.g., humans and chimpanzees) are used for calculations, then false-positive predictions could be found. Positive or negative results would certainly be considered as a part of a more comprehensive analysis including protein alignment, mutation localization in a protein's functional domains, and examining mutation-induced physicochemical changes. The p.Thr943Ile mutation is located in the first TS repeat in the protein's C-terminal region. Interestingly, it has been shown that the C-terminal region of some ADAMTS proteins (e.g., ADAMTS1, ADAMTS4) is necessary for both substrate specificity and localization (39 and references therein, 40). We thus hypothesized that the p.Thr943Ile mutation might alter ADAMTS19 substrate-binding properties and modify enzyme selectivity. The mutant protein could also display abnormal cell/tissue localization. Such features regarding an ovarian context might be linked to abnormal somatic cells' extracellular matrix turnover, leading to defects in follicular development and thus to POF. It would be interesting to perform in vitro functional tests to validate this hypothesis as well as to create pertinent *Adamts19* mouse models (e.g., knock-out, knock-in).

The POF19 patient, who was affected by secondary amenorrhea, had two heterozygous coding variants in *BMPR2* and *LHCGR* genes (Fig. 1). *BMPR2* (bone morphogenetic protein receptor type II) encodes a serine-threonine kinase, which is responsible for binding bone morphogenetic proteins (BMP) (49, 50). BMP factors belong to the TGF- β superfamily of growth factors, which are involved in a wide variety of biological processes, including reproduction (51). After secretion to the extracellular space, BMP ligands bind to transmembrane type II receptors, which in turn transphosphorylate type I receptors (52). Type I receptor activation leads to SMAD protein phosphorylation and then to nuclear translocation of signaling for regulating target genes (53). BMP15 and GDF9 ligands, two key actors in ovarian physiology, have been related to *BMPR2* activation in mice and humans (54–56). In these species, BMP15:GDF9 heterodimers (produced by oocytes) have higher biological activity than homodimers (BMP15:BMP15 or GDF9:GDF9). It has been shown that BMP15:GDF9 heterodimers act via the *BMPR2*-ALK4/5/7-ALK6 receptor complex located in granulosa cells (56). Since *BMP15* sequence variants have been related to POF etiology, we estimate that *BMPR2* coding mutations might also cause the disease (6, 17, 57). The heterozygous mutation found in our patient strongly suggested a deleterious effect since it was not present in our control population groups and it displays a minimal allele frequency <.01 (rs150642992). In silico analysis has shown that the *BMPR2* p.Ser987Phe mutation affects a highly evolutionary conserved residue during evolution. SIFT and PolyPhen2 predictions agreed with such an assumption (SIFT, 0.00; PolyPhen2, probably damaging; Table 2). At the physicochemical level, the p.Ser987Phe mutation implies a drastic effect because serine is a small, polar amino acid, while phenylalanine is a large, aromatic residue. This mutation affects the transmembrane receptor's intracellular C-terminal tail region, which interacts with proteins involved in cellular features such as ion transport,

transcription, cytoskeleton structure/modulation, and trafficking (58–60). Furthermore, this region might affect SMAD intracellular signaling, and we thus hypothesize that the *BMPR2*-p.Ser987Phe mutation in granulosa cells might interfere with BMP15 downstream signaling, thereby contributing to POF etiology. It should be noted that *BMPR2* encoding mutations (most being nonsense mutations) have been related to primary pulmonary hypertension (PPH), a disease having an autosomal dominant inheritance pattern (61–65). Our patient had no clinical signs or background of PPH, which might be explained by the disease's low penetrance (20%–30%) (64). Concerning individuals with PPH, an association with POF has not been reported to date, probably because it has not been systematically explored or reported.

POF19 patient is also affected by the heterozygous *LHCGR* c.296A→G (p.Asn99Ser) mutation. As for the *ADAMTS19* and *BMPR2* mutations described above, control population screening and bioinformatics studies suggested a potentially deleterious effect. This mutation, located in the protein's extracellular domain, is novel and affects an amino acid that is conserved during vertebrate species' evolution. *LHCGR* and *FSHR* were the first genes for which coding mutations were related to POF (7, 8). Only homozygous mutations in these genes in XX women have been definitely linked to POF etiology. However, this feature does not rule out heterozygous variants contributing to the phenotype. A recent report described an association of a heterozygote insertion of six nucleotides in *LHCGR* with amenorrhea and poor oocyte recovery during IVF (66). In our patient, both *ADAMTS19* and *LHCGR* mutations may have had additive pathogenic effects. Family segregation of mutant alleles would support such a hypothesis (Supplemental Fig. 1). Nevertheless, both mutations deserve functional tests to clarify their contribution to the phenotype.

POF23 was affected by the heterozygous *LHCGR*-p.Ser176Pro mutation (Fig. 1). As this mutation was absent from our control populations and had computational predictions (protein alignments; SIFT, 0.03) compatible with a deleterious effect, this variant might contribute to patient phenotype (Table 2).

CONCLUSIONS

Taken together, our results lead to mutations in two novel genes (*ADAMTS19* and *BMPR2*) being potentially related to POF pathogenesis. We have also proposed that heterozygous *LHCGR* mutations might contribute, with variants in further POF candidate genes, to premature menopause. These assumptions must be validated by further sequencing projects and functional tests. We thus recommend NGS as a powerful tool for identifying new molecular actors in POF and for future diagnostic/prognostic purposes.

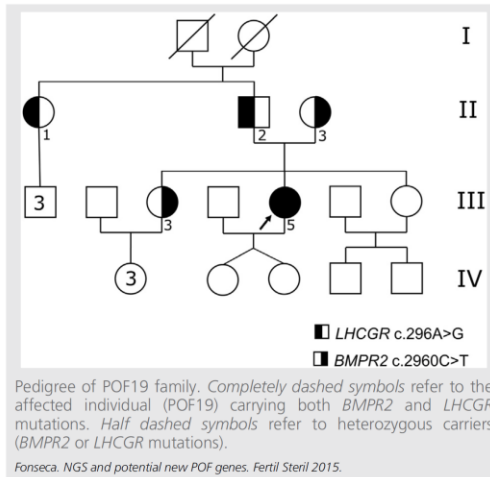
REFERENCES

1. Cox L, Liu JH. Primary ovarian insufficiency: an update. *Int J Womens Health* 2014;6:235–43.
2. Coulam CB. Premature gonadal failure. *Fertil Steril* 1982;38:645–55.

3. Timmreck LS, Reindollar RH. Contemporary issues in primary amenorrhea. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2003;30:287–302.
4. Zinn AR, Ross JL. Turner syndrome and haploinsufficiency. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8:322–7.
5. Sherman SL. Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 2000;97:189–94.
6. Laissue P, Vinci G, Veitia RA, Fellous M. Recent advances in the study of genes involved in non-syndromic premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol* 2008;282:101–11.
7. Aittomäki K, Lucena JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J, et al. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 1995;82:959–68.
8. Latronico AC, Anasti J, Arnhold IJ, Rapaport R, Mendonça BB, Bloise W, et al. Brief report: testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. *N Engl J Med* 1996;334:507–12.
9. Beau I, Touraine P, Meduri G, Gougeon A, Desroches A, Matuchansky C, et al. A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. *J Clin Invest* 1998;102:1352–9.
10. Touraine P, Beau I, Gougeon A, Meduri G, Desroches A, Pichard C, et al. New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype. *Mol Endocrinol* 1999;13:1844–54.
11. Rannikko A, Pakarinen P, Manna PR, Beau I, Misrahi M, Aittomäki K, et al. Functional characterization of the human FSH receptor with an inactivating Ala189Val mutation. *Mol Hum Reprod* 2002;8:311–7.
12. Doherty E, Pakarinen P, Tiitinen A, Kilaavuori I, Huhtaniemi I, Forrest S, et al. A novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1151–5.
13. Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet* 2004;75:106–11.
14. Qin Y, Choi Y, Zhao H, Simpson JL, Chen Z-J, Rajkovic A. NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* 2007;81:576–81.
15. Zhao H, Chen Z-J, Qin Y, Shi Y, Wang S, Choi Y, et al. Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* 2008;82:1342–8.
16. Lourenço D, Brauner R, Lin L, De Perdigão A, Weryha G, Muresan M, et al. Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *N Engl J Med* 2009;360:1200–10.
17. Rossetti R, Di Pasquale E, Marozzi A, Bione S, Toniolo D, Grammatico P, et al. BMP15 mutations associated with primary ovarian insufficiency cause a defective production of bioactive protein. *Hum Mutat* 2009;30:804–10.
18. Wu X, Wang B, Dong Z, Zhou S, Liu Z, Shi G, et al. A NANOS3 mutation linked to protein degradation causes premature ovarian insufficiency. *Cell Death Dis* 2013;4:e825.
19. Caburet S, Arboleda VA, Llano E, Overbeek PA, Barbero JL, Oka K, et al. Mutant cohesin in premature ovarian failure. *N Engl J Med* 2014;370:943–9.
20. Santos MG, Machado AZ, Martins CN, Domenice S, Costa EM, Nishi MY, et al. Homozygous inactivating mutation in NANOS3 in two sisters with primary ovarian insufficiency. *Biomed Res Int* 2014;2014:787465.
21. Hodges E, Xuan Z, Balija V, Kramer M, Molla MN, Smith SW, et al. Genome-wide in situ exon capture for selective resequencing. *Nat Genet* 2007;39:1522–7.
22. Albert TJ, Molla MN, Muzny DM, Nazareth L, Wheeler D, Song X, et al. Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization. *Nat Methods* 2007;4:903–5.
23. Boycott KM, Vanstone MR, Bulman DE, MacKenzie AE. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. *Nat Rev Genet* 2013;14:681–91.
24. Kiezun A, Garimella K, Do R, Stitzel NO, Neale BM, McLaren PJ, et al. Exome sequencing and the genetic basis of complex traits. *Nat Genet* 2012;44:623–30.
25. Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell* 2013;155:27–38.
26. Shyr D, Liu Q. Next generation sequencing in cancer research and clinical application. *Biol Proced Online* 2013;15:4.
27. Lange LA, Hu Y, Zhang H, Xue C, Schmidt EM, Tang Z-Z, et al. Whole-exome sequencing identifies rare and low-frequency coding variants associated with LDL cholesterol. *Am J Hum Genet* 2014;94:233–45.
28. Ortega-Recalde O, Vergara JL, Fonseca DJ, Rios X, Mosquera H, Bermúdez OM, et al. Whole-exome sequencing enables rapid determination of xeroderma pigmentosum molecular etiology. *PLoS One* 2013;8:e64692.
29. Patiño LC, Battu R, Ortega-Recalde O, Nallathambi J, Anandula VR, Renukaradhya U, et al. Exome sequencing is an efficient tool for variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis molecular diagnosis. *PLoS One* 2014;9:3–7.
30. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010;7:248–9.
31. Ng PC, Henikoff S. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3812–4.
32. Santoro N. Update in hyper- and hypogonadotropic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:3281–8.
33. Matzuk MM, Lamb DJ. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat Cell Biol* 2002;4(Suppl):s41–9.
34. Roy A, Matzuk MM. Deconstructing mammalian reproduction: using knock-outs to define fertility pathways. *Reproduction* 2006;131:207–19.
35. Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 2008;14:1197–213.
36. Jagarlamudi K, Reddy P, Adhikari D, Liu K. Genetically modified mouse models for premature ovarian failure (POF). *Mol Cell Endocrinol* 2010;315:1–10.
37. Jagarlamudi K, Rajkovic A. Oogenesis: transcriptional regulators and mouse models. *Mol Cell Endocrinol* 2012;356:31–9.
38. Cal S, Obaya AJ, Llamazares M, Garabaya C, Quesada V, López-Otin C. Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene* 2002;283:49–62.
39. Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J* 2005;386:15–27.
40. Apte SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J Biol Chem* 2009;284:31493–7.
41. Nicholson AC, Malik S-B, Logsdon JM, Van Meir EG. Functional evolution of ADAMTS genes: evidence from analyses of phylogeny and gene organization. *BMC Evol Biol* 2005;5:11.
42. Menke DB, Page DC. Sexually dimorphic gene expression in the developing mouse gonad. *Gene Expr Patterns* 2002;2:359–67.
43. McClelland KS, Wainwright EN, Bowles J, Koopman P. Rapid screening of gene function by systemic delivery of morpholino oligonucleotides to live mouse embryos. *PLoS One* 2015;10:e0114932.
44. Bouma GJ, Hart GT, Washburn LL, Recknagel AK, Eichler EM. Using real time RT-PCR analysis to determine multiple gene expression patterns during XX and XY mouse fetal gonad development. *Gene Expr Patterns* 2004;5:141–9.
45. Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3.
46. Knauff EA, Franke L, van Es MA, van den Berg LH, van der Schouw YT, Laven JS, et al. Genome-wide association study in premature ovarian failure patients suggests ADAMTS19 as a possible candidate gene. *Hum Reprod* 2009;24:2372–8.
47. Pyun JA, Kim S, Cha DH, Kwack K. Epistasis between IGF2R and ADAMTS19 polymorphisms associates with premature ovarian failure. *Hum Reprod* 2013;28:3146–54.
48. Pyun JA, Kim S, Kwack K. Epistasis between polymorphisms in ACVR2B and ADAMTS19 is associated with premature ovarian failure. *Menopause* 2015;22:212–6.
49. Nohno T, Ishikawa T, Saito T, Hosokawa K, Noji S, Wolsing DH, et al. Identification of a human type II receptor for bone morphogenetic protein-4 that forms differential heteromeric complexes with bone morphogenetic protein type I receptors. *J Biol Chem* 1995;270:22522–6.

50. Liu F, Ventura F, Doody J, Massagué J. Human type II receptor for bone morphogenetic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* 1995;15:3479–86.
51. Chang H, Brown CW, Matzuk MM. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 2002;23:787–823.
52. Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* 2004;25:72–101.
53. Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev* 2005;19:2783–810.
54. Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S. Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *J Biol Chem* 2003;278:304–10.
55. Pulkki MM, Mottershead DG, Pasternack AH, Muggalla P, Ludlow H, van Dinther M, et al. A covalently dimerized recombinant human bone morphogenetic protein-15 variant identifies bone morphogenetic protein receptor type 1B as a key cell surface receptor on ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 2012;153:1509–18.
56. Peng J, Li Q, Wigglesworth K, Rangarajan A, Kattamuri C, Peterson RT, et al. Growth differentiation factor 9: bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:E776–85.
57. Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, Kuttann F, Ritvos O, Aittomaki K, et al. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol* 2006;154:739–44.
58. Machado RD, Rudarakanchana N, Atkinson C, Flanagan JA, Harrison R, Morrell NW, et al. Functional interaction between BMPR-II and Tctex-1, a light chain of dynein, is isoform-specific and disrupted by mutations underlying primary pulmonary hypertension. *Hum Mol Genet* 2003;12:3277–86.
59. Foletta VC, Lim MA, Soosairajah J, Kelly AP, Stanley EG, Shannon M, et al. Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J Cell Biol* 2003;162:1089–98.
60. Hassel S, Eichner A, Yakymovych M, Hellman U, Knaus P, Souchelnytskyi S. Proteins associated with type II bone morphogenetic protein receptor (BMPR-II) and identified by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2004;4:1346–58.
61. Lane KB, Machado RD, Pauculo MW, Thomson JR, Phillips JA, Loyd JE, et al. Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat Genet* 2000;26:81–4.
62. Deng Z, Haghighi F, Helleby L, Vanterpool K, Horn EM, Barst RJ, et al. Fine mapping of PPH1, a gene for familial primary pulmonary hypertension, to a 3-cM region on chromosome 2q33. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1055–9.
63. Machado RD, Aldred MA, James V, Harrison RE, Patel B, Schwalbe EC, et al. Mutations of the TGF-beta type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat* 2006;27:121–32.
64. Li W, Dunmore BJ, Morrell NW. Bone morphogenetic protein type II receptor mutations causing protein misfolding in heritable pulmonary arterial hypertension. *Proc Am Thorac Soc* 2010;7:395–8.
65. Ma L, Chung WK. The genetic basis of pulmonary arterial hypertension. *Hum Genet* 2014;133:471–9.
66. Bentov Y, Kenigsberg S, Casper RF. A novel luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mutation associated with amenorrhea, low oocyte yield, and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2012;97:1165–8.

SUPPLEMENTAL FIGURE 1



SUPPLEMENTAL TABLE 1

Sequences used for multiple protein alignments.

Protein	Species	Protein sequence (GI)
ADAMTS19	<i>Homo sapiens</i>	112789555
	<i>Bos taurus</i>	194668875
	<i>Bison bison</i>	742173366
	<i>Pygoscelis adeliae</i>	690436459
	<i>Gallus gallus</i>	513231250
	<i>Xenopus tropicalis</i>	512817668
	<i>Rattus norvegicus</i>	564393555
	<i>Mus musculus</i>	28202057
BMP2	<i>Homo sapiens</i>	15451916
	<i>Macaca mulatta</i>	383409919
	<i>Bos taurus</i>	296490468
	<i>Sus scrofa</i>	325974528
	<i>Gallus gallus</i>	47825379
	<i>Xenopus laevis</i>	147901570
	<i>Rattus norvegicus</i>	281371326
	<i>Mus musculus</i>	6680804
LHCGR	<i>Homo sapiens</i>	106067657
	<i>Bos taurus</i>	41386703
	<i>Sus scrofa</i>	47523950
	<i>Gallus gallus</i>	45384388
	<i>Xenopus tropicalis</i>	512844990
	<i>Rattus norvegicus</i>	6981160
	<i>Mus musculus</i>	7305233
	<i>Danio Rerio</i>	190336595

Note: GI refers to the protein code from the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>).

Fonseca. NGS and potential new POF genes. Fertil Steril 2015.

12 Bibliografía

- Adams, J. C., and J. Lawler, 2004 The thrombospondins. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36: 961-968.
- Adams, S., K. Barracchini, T. Simonis, D. Stroncek and F. Maricola, 2000 High throughput HLA sequence-based typing (SBT) utilizing the ABI Prism 3700 DNA Analyzer. *Tumori* 87: S40-43.
- Adzhubei, I. A., S. Schmidt, L. Peshkin, V. E. Ramensky, A. Gerasimova *et al.*, 2010 A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods* 7: 248-249.
- Ahmadian, A., M. Ehn and S. Hober, 2006 Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clinica chimica acta* 363: 83-94.
- Aittomäki, K., J. D. Lucena, P. Pakarinen, P. Sistonen, J. Tapanainen *et al.*, 1995 Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 82: 959-968.
- Allen, E., A. Sullivan, M. Marcus, C. Small, C. Dominguez *et al.*, 2007 Examination of reproductive aging milestones among women who carry the FMR1 premutation. *Human reproduction* 22: 2142-2152.
- Amato, P., and A. C. Roberts, 2001 Transient ovarian failure: a complication of uterine artery embolization. *Fertility and sterility* 75: 438-439.
- Anasti, J. N., 1998 Premature ovarian failure: an update. *Fertility and sterility* 70: 1-15.
- Anders, A., S. Gilbert, W. Garten, R. Postina and F. Fahrenholz, 2001 Regulation of the α -secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *The FASEB Journal* 15: 1837-1839.
- Apte, S. S., 2009 A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 284: 31493-31497.
- Ashley, C. T., K. D. Wilkinson, D. Reines and S. T. Warren, 1993 FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science* 262: 563-566.
- Bachelot, A., A. Rouxel, N. Massin, J. Dulon, C. Courtillot *et al.*, 2009 Phenotyping and genetic studies of 357 consecutive patients presenting with premature ovarian failure. *European Journal of Endocrinology* 161: 179-187.
- Bakalov, V. K., J. N. Anasti, K. A. Calis, V. H. Vanderhoof, A. Premkumar *et al.*, 2005 Autoimmune oophoritis as a mechanism of follicular dysfunction in women with 46, XX spontaneous premature ovarian failure. *Fertility and sterility* 84: 958-965.
- Baker, A. H., D. R. Edwards and G. Murphy, 2002 Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of cell science* 115: 3719-3727.
- Barnett, K., C. Schilling, C. Greenfeld, D. Tomic and J. Flaws, 2006 Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Human reproduction update* 12: 537-555.
- Bashamboo, A., and K. McElreavey, 2010 NR5A1/SF-1 and development and function of the ovary, pp. 177-182 in *Annales d'endocrinologie*. Elsevier.
- Beerendonk, C., and D. Braat, 2005 Present and future options for the preservation of fertility in female adolescents with cancer.
- Behr, S., M. Mätzig, A. Levin, H. Eickhoff and C. Heller, 1999 A fully automated multi-capillary electrophoresis device for DNA analysis. *Chromatographia* 49: S81-S82.
- Belvisi, L., F. Bombelli, L. Sironi and N. Doldi, 1993 Organ-specific autoimmunity in patients with premature ovarian failure. *Journal of endocrinological investigation* 16: 889-892.
- Bentley, D. R., S. Balasubramanian, H. P. Swerdlow, G. P. Smith, J. Milton *et al.*, 2008 Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *nature* 456: 53-59.

- Bevitt, D., Z. Li, M. Barker, M. Clarke and N. McKie, 2005 Analysis of ADAMTS6 transcripts reveals complex alternative splicing and a potential role for the 5'untranslated region in translational control. *Gene*.
- Bevitt, D. J., J. Mohamed, J. B. Catterall, Z. Li, C. E. Arris *et al.*, 2003 Expression of ADAMTS metalloproteinases in the retinal pigment epithelium derived cell line ARPE-19: transcriptional regulation by TNF α . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1626: 83-91.
- Beysen, D., J. Raes, B. Leroy, A. Lucassen, J. Yates *et al.*, 2005 Deletions involving long-range conserved nongenic sequences upstream and downstream of FOXL2 as a novel disease-causing mechanism in blepharophimosis syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 77: 205-218.
- Bharath, R., A. Unnikrishnan, M. Thampy, A. Anilkumar, B. Nisha *et al.*, 2010 Turner syndrome and its variants. *The Indian Journal of Pediatrics* 77: 193-195.
- Bione, S., C. Sala, C. Manzini, G. Arrigo, O. Zuffardi *et al.*, 1998 A human homologue of the *Drosophila melanogaster* diaphanous gene is disrupted in a patient with premature ovarian failure: evidence for conserved function in oogenesis and implications for human sterility. *The American Journal of Human Genetics* 62: 533-541.
- Bodega, B., C. Porta, P. Crosignani, E. Ginelli and A. Marozzi, 2004 Mutations in the coding region of the FOXL2 gene are not a major cause of idiopathic premature ovarian failure. *Molecular human reproduction* 10: 555-557.
- Brocker, C. N., V. Vasiliou and D. W. Nebert, 2009 Evolutionary divergence and functions of the ADAM and ADAMTS gene families. *Hum Genomics* 4: 43-55.
- Caburet, S., V. A. Arboleda, E. Llano, P. A. Overbeek, J. L. Barbero *et al.*, 2014 Mutant cohesin in premature ovarian failure. *New England Journal of Medicine* 370: 943-949.
- Cal, S., A. J. Obaya, M. a. Llamazares, C. Garabaya, V. c. Quesada *et al.*, 2002 Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene* 283: 49-62.
- Campion, R. D. N., and J. C. C. Tec, 2004 De Ácidos Nucleicos.
- Carballeira, N., M. Nazabal, J. Brito and O. Garcia, 1990 Purification of a thermostable DNA polymerase from *Thermus thermophilus* HB8, useful in the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 9: 276-281.
- Carré, G.-A., I. Couty, C. Hennequet-Antier and M. S. Govoroun, 2011 Gene expression profiling reveals new potential players of gonad differentiation in the chicken embryo.
- Carrera Cachaza, N., 2012 Estudio genético en esquizofrenia: análisis de variantes funcionales para la identificación de factores de predisposición.
- Cocquet, J., E. De Baere, M. Gareil, M. Pannetier, X. Xia *et al.*, 2003 Structure, evolution and expression of the FOXL2 transcription unit. *Cytogenetic and genome research* 101: 206-211.
- Colige, A., S.-W. Li, A. L. Sieron, B. V. Nusgens, D. J. Prockop *et al.*, 1997 cDNA cloning and expression of bovine procollagen I N-proteinase: a new member of the superfamily of zinc-metalloproteinases with binding sites for cells and other matrix components. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 2374-2379.
- Consortium, I. H. G. S., 2004 Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931-945.
- Conway, G. S., 1996 Clinical manifestations of genetic defects affecting gonadotrophins and their receptors. *Clinical endocrinology* 45: 657-663.
- Conway, G. S., 2000 Premature ovarian failure. *British medical bulletin* 56: 643-649.

- Coulam, C. B., S. C. Adamson and J. F. ANNEGERS, 1986 Incidence of premature ovarian failure. *Obstetrics & Gynecology* 67: 604-606.
- Coveney, D., J. Cool, T. Oliver and B. Capel, 2008 Four-dimensional analysis of vascularization during primary development of an organ, the gonad. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 7212-7217.
- Crisponi, L., M. Deiana, A. Loi, F. Chiappe, M. Uda *et al.*, 2001 The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nature genetics* 27: 159-166.
- Crisponi, L., M. Uda, M. Deiana, A. Loi, R. Nagaraja *et al.*, 2004 FOXL2 inactivation by a translocation 171 kb away: analysis of 500 kb of chromosome 3 for candidate long-range regulatory sequences. *Genomics* 83: 757-764.
- Chang, H., C. W. Brown and M. M. Matzuk, 2002 Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 23: 787-823.
- Chrumbach, A., and D. Rodbard, 1971 Polyacrylamide gel electrophoresis. *Science* 172: 440-451.
- Davis, S. R., 1996 Premature ovarian failure. *Maturitas* 23: 1-8.
- Davison, R. M., M. Fox and G. Conway, 2000 Mapping of the POF1 locus and identification of putative genes for premature ovarian failure. *Molecular human reproduction* 6: 314-318.
- De Baere, E., B. Lemercier, S. Christin-Maitre, D. Durval, L. Messiaen *et al.*, 2002 FOXL2 mutation screening in a large panel of POF patients and XX males. *Journal of medical genetics* 39: e43-e43.
- Di Pasquale, E., P. Beck-Peccoz and L. Persani, 2004 Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *The American Journal of Human Genetics* 75: 106-111.
- Di Pasquale, E., R. Rossetti, A. Marozzi, B. Bodega, S. Borgato *et al.*, 2006 Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91: 1976-1979.
- Di Prospero, F., S. Luzi and Z. Iacopini, 2004 Cigarette smoking damages women's reproductive life. *Reproductive biomedicine online* 8: 246-247.
- Dixit, H., L. K. Rao, V. Padmalatha, M. Kanakavalli, M. Deenadayal *et al.*, 2005 Mutational screening of the coding region of growth differentiation factor 9 gene in Indian women with ovarian failure. *Menopause* 12: 749-754.
- Dixit, H., L. K. Rao, V. V. Padmalatha, M. Kanakavalli, M. Deenadayal *et al.*, 2006 Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Human genetics* 119: 408-415.
- Dolnik, V., 1999 DNA sequencing by capillary electrophoresis (review). *Journal of biochemical and biophysical methods* 41: 103-119.
- Dong, J., D. F. Albertini, K. Nishimori, T. R. Kumar, N. Lu *et al.*, 1996 Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis.
- Dressman, D., H. Yan, G. Traverso, K. W. Kinzler and B. Vogelstein, 2003 Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 8817-8822.
- Droege, M., and B. Hill, 2008 The Genome Sequencer FLX™ System—Longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *Journal of biotechnology* 136: 3-10.
- Edwards, D. R., M. M. Handsley and C. J. Pennington, 2008 The ADAM metalloproteinases. *Molecular aspects of medicine* 29: 258-289.
- Eid, J., A. Fehr, J. Gray, K. Luong, J. Lyle *et al.*, 2009 Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science* 323: 133-138.

- Erickson, G. F., and S. Shimasaki, 2003 The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 1-20.
- Fechner, P. Y., M. L. Davenport, R. L. Qualy, J. L. Ross, D. F. Gunther *et al.*, 2006 Differences in follicle-stimulating hormone secretion between 45, X monosomy Turner syndrome and 45, X/46, XX mosaicism are evident at an early age. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91: 4896-4902.
- Fedurco, M., A. Romieu, S. Williams, I. Lawrence and G. Turcatti, 2006 BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic acids research* 34: e22-e22.
- Fernandes, R. J., S. Hirohata, J. M. Engle, A. Colige, D. H. Cohn *et al.*, 2001 Procollagen II amino propeptide processing by ADAMTS-3 insights on dermatosparaxis. *Journal of Biological Chemistry* 276: 31502-31509.
- Flanagan, S. E., A.-M. Patch and S. Ellard, 2010 Using SIFT and PolyPhen to predict loss-of-function and gain-of-function mutations. *Genetic testing and molecular biomarkers* 14: 533-537.
- Formstecher, E., S. Aresta, V. Collura, A. Hamburger, A. Meil *et al.*, 2005 Protein interaction mapping: a *Drosophila* case study. *Genome research* 15: 376-384.
- Fortune, J., E. Willis, P. Bridges and C. Yang, 2009 The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. *Animal reproduction/Colegio Brasileiro de Reproducao Animal* 6: 60.
- Fromont-Racine, M., J.-C. Rain and P. Legrain, 1997 Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nature genetics* 16: 277-282.
- Galvin, N. M., M. W. Clark and M. Reddy, 1998 CEQ™ 2000 DNA Analysis System Performance, Beckman Coulter. Inc., Technical Information Bulletin T-1854A.
- Gao, G., J. Westling, V. P. Thompson, T. D. Howell, P. E. Gottschall *et al.*, 2002 Activation of the proteolytic activity of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by C-terminal truncation. *Journal of Biological Chemistry* 277: 11034-11041.
- Gao, S., C. De Geyter, K. Kossowska and H. Zhang, 2007 FSH stimulates the expression of the ADAMTS-16 protease in mature human ovarian follicles. *Molecular human reproduction* 13: 465-471.
- Gelse, K., E. Pöschl and T. Aigner, 2003 Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews* 55: 1531-1546.
- Georges, A., A. Auguste, L. Bessière, A. Vanet, A.-L. Todeschini *et al.*, 2014 FOXL2: a central transcription factor of the ovary. *Journal of molecular endocrinology* 52: R17-R33.
- Gersak, K., S. E. Harris, W. J. Smale and A. N. Shelling, 2004 A novel 30 bp deletion in the FOXL2 gene in a phenotypically normal woman with primary amenorrhoea: case report. *Human Reproduction* 19: 2767-2770.
- Gietz, R. D., A. Robbins, K. C. Graham, B. Triggs-Raine and R. A. Woods, 1997 Identification of proteins that interact with a protein of interest: applications of the yeast two-hybrid system, pp. 67-79 in *Novel Methods in Molecular and Cellular Biochemistry of Muscle*. Springer.
- Goswami, D., and G. S. Conway, 2005 Premature ovarian failure. *Human reproduction update* 11: 391-410.
- Gougeon, A., 1996 Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine reviews* 17: 121-155.
- Hardin, S., X. Gao, J. Briggs, R. Willson and S.-C. Tu, 2008 Methods for real-time single molecule sequence determination, pp. Google Patents.

- Harismendy, O., P. C. Ng, R. L. Strausberg, X. Wang, T. B. Stockwell *et al.*, 2009 Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. *Genome Biol* 10: R32.
- Harris, S., A. Chand, I. Winship, K. Gersak, K. Aittomäki *et al.*, 2002 Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Molecular human reproduction* 8: 729-733.
- Harris, T. D., P. R. Buzby, H. Babcock, E. Beer, J. Bowers *et al.*, 2008 Single-molecule DNA sequencing of a viral genome. *Science* 320: 106-109.
- Howell, S., and S. Shalet, 1998 Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 27: 927-943.
- Huntriss, J., M. Hinkins and H. Picton, 2006 cDNA cloning and expression of the human NOBOX gene in oocytes and ovarian follicles. *Molecular human reproduction* 12: 283-289.
- Innis, M. A., K. B. Myambo, D. H. Gelfand and M. Brow, 1988 DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85: 9436-9440.
- Iruela-Arispe, M. L., M. Lombardo, H. C. Kruttsch, J. Lawler and D. D. Roberts, 1999 Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats. *Circulation* 100: 1423-1431.
- Jacobi, C. L., L. J. Rudigier, H. Scholz and K. M. Kirschner, 2014 Transcriptional regulation by the Wilms tumor protein, Wt1, suggests a role of the metalloproteinase Adamts16 in murine genitourinary development. *Journal of Biological Chemistry* 289: 11566-11566.
- Jin, P., and S. T. Warren, 2000 Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Human molecular genetics* 9: 901-908.
- Jones, G. C., and G. P. Riley, 2005 ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther* 7: 160-169.
- Kalantaridou, S. N., S. R. Davis and L. M. Nelson, 1998 Premature ovarian failure. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 27: 989-1006.
- Kashiwagi, M., M. Tortorella, H. Nagase and K. Brew, 2001 TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). *Journal of Biological Chemistry* 276: 12501-12504.
- Keene, D. R., E. Engvall and R. W. Glanville, 1988 Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network. *The Journal of cell biology* 107: 1995-2006.
- Kevorkian, L., D. A. Young, C. Darrah, S. T. Donell, L. Shepstone *et al.*, 2004 Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis & Rheumatism* 50: 131-141.
- Kislinger, T., and A. O. Gramolini, 2010 Proteome analysis of mouse model systems: A tool to model human disease and for the investigation of tissue-specific biology. *Journal of proteomics* 73: 2205-2218.
- Knauff, E. A., L. Franke, M. A. Van Es, L. H. Van den Berg, Y. T. Van der Schouw *et al.*, 2009 Genome-wide association study in premature ovarian failure patients suggests ADAMTS19 as a possible candidate gene. *Human reproduction* 24: 2372-2378.
- Krauss, C. M., R. N. Turksoy, L. Atkins, C. McLaughlin, L. G. Brown *et al.*, 1987 Familial premature ovarian failure due to an interstitial deletion of the long arm of the X chromosome. *New England Journal of Medicine* 317: 125-131.
- Kreiner, D., K. Drosch, D. Navot, R. Scott and Z. Rosenwaks, 1988 Spontaneous and pharmacologically induced remissions in patients with premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 72: 926-928.

- Kuno, K., N. Kanada, E. Nakashima, F. Fujiki, F. Ichimura *et al.*, 1997 Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *Journal of Biological Chemistry* 272: 556-562.
- Laissue, P., 2015 Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: From genetic linkage analysis to next generation sequencing. *Molecular and cellular endocrinology*.
- Laissue, P., S. Christin-Maitre, P. Touraine, F. Kuttenn, O. Ritvos *et al.*, 2006 Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *European Journal of Endocrinology* 154: 739-744.
- Laissue, P., G. Vinci, R. A. Veitia and M. Fellous, 2008 Recent advances in the study of genes involved in non-syndromic premature ovarian failure. *Molecular and cellular endocrinology* 282: 101-111.
- Lampe, A. K., K. M. Flanigan, K. M. Bushby and D. Hicks, 2012 Collagen type VI-related disorders.
- Landegren, U., R. Kaiser, J. Sanders and L. Hood, 1988 A ligase-mediated gene detection technique. *Science* 241: 1077-1080.
- Latronico, A. C., Y. Chai, I. J. Arnhold, X. Liu, B. B. Mendonca *et al.*, 1998 A homozygous microdeletion in helix 7 of the luteinizing hormone receptor associated with familial testicular and ovarian resistance is due to both decreased cell surface expression and impaired effector activation by the cell surface receptor. *Molecular Endocrinology* 12: 442-450.
- Le Goff, C., and V. Cormier-Daire, 2011 The ADAMTS (L) family and human genetic disorders. *Human molecular genetics* 20: R163-R167.
- Leamon, J. H., W. L. Lee, K. R. Tartaro, J. R. Lanza, G. J. Sarkis *et al.*, 2003 A massively parallel PicoTiterPlate™ based platform for discrete picoliter-scale polymerase chain reactions. *Electrophoresis* 24: 3769-3777.
- Lin, S.-Y., D. Phillips and D. de Kretser, 2003 Regulation of ovarian function by the TGF-beta superfamily and follistatin. *Reproduction* 126: 133-148.
- Lourenço, D., R. Brauner, L. Lin, A. De Perdigo, G. Weryha *et al.*, 2009 Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *New England Journal of Medicine* 360: 1200-1210.
- Luborsky, J., I. Visintin, S. Boyers, T. Asari, B. Caldwell *et al.*, 1990 Ovarian Antibodies Detected by Immobilized Antigen Immunoassay in Patients with Premature Ovarian Failure*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 70: 69-75.
- Luo, X., Y. Ikeda and K. L. Parker, 1994 A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77: 481-490.
- Madsen, B. L., L. Giudice and S. S. Donaldson, 1995 Radiation-induced premature menopause: a misconception. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 32: 1461-1464.
- Matzuk, M. M., and K. H. Burns, 2012 Genetics of mammalian reproduction: modeling the end of the germline. *Annual review of physiology* 74: 503-528.
- Matzuk, M. M., and D. J. Lamb, 2008 The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature medicine* 14: 1197-1213.
- Maxam, A. M., and W. Gilbert, 1977 A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74: 560-564.
- McClelland, K. S., E. N. Wainwright, J. Bowles and P. Koopman, 2015 Rapid screening of gene function by systemic delivery of morpholino oligonucleotides to live mouse embryos. *PLoS one* 10.
- McKinlay, S. M., D. J. Brambilla and J. G. Posner, 1992 The normal menopause transition. *Maturitas* 14: 103-115.

- Mehta, G. D., S. M. A. Rizvi and S. K. Ghosh, 2012 Cohesin: a guardian of genome integrity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1823: 1324-1342.
- Menke, D. B., and D. C. Page, 2002 Sexually dimorphic gene expression in the developing mouse gonad. *Gene Expression Patterns* 2: 359-367.
- Metzker, M. L., 2005 Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome research* 15: 1767-1776.
- Metzker, M. L., 2009 Sequencing in real time. *Nature biotechnology* 27: 150-151.
- Metzker, M. L., 2010 Sequencing technologies—the next generation. *Nature Reviews Genetics* 11: 31-46.
- Mochizuki, S., and Y. Okada, 2007 ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer science* 98: 621-628.
- Moore, R. K., and S. Shimasaki, 2005 Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. *Molecular and cellular endocrinology* 234: 67-73.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn *et al.*, 1992 Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology Series*: 17-17.
- Mullis, K. B., 1990 The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262: 56-61.
- Mullis, K. B., F. Ferré and R. A. Gibbs, 1994 *The polymerase chain reaction*. Birkhauser Boston Inc.
- Ng, P. C., and S. Henikoff, 2003 SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic acids research* 31: 3812-3814.
- Niewiarowski, S., M. A. McLane, M. Kloczewiak and G. J. Stewart, 1994 Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors, pp. 289-300 in *Seminars in hematology*.
- Ohtsu, H., P. J. Dempsey and S. Eguchi, 2006 ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 291: C1-C10.
- Pasquino, A. M., F. Passeri, I. Pucarelli, M. Segni and G. Municchi, 1997 Spontaneous Pubertal Development in Turner's Syndrome 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82: 1810-1813.
- Patel, D. H., S. G. Wi and H. J. Bae, 2009 Modification of overlap extension PCR: a mutagenic approach. *Indian Journal of Biotechnology* 8: 183-186.
- Patten, J. L., and M. A. Levine, 1990 Immunochemical Analysis of the α -Subunit of the Stimulatory G-Protein of Adenylyl Cyclase in Patients with Albright's Hereditary Osteodystrophy*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 71: 1208-1214.
- Pekonen, F., R. Sieberg, T. Mäkinen, A. Miettinen and O. Yli-Korkala, 1986 Immunological disturbances in patients with premature ovarian failure. *Clinical endocrinology* 25: 1-6.
- Peluffo, M. C., M. J. Murphy, S. Talcott Baughman, R. L. Stouffer and J. D. Hennebold, 2011 Systematic analysis of protease gene expression in the rhesus macaque ovulatory follicle: metalloproteinase involvement in follicle rupture. *Endocrinology* 152: 3963-3974.
- Peng, J., Q. Li, K. Wigglesworth, A. Rangarajan, C. Kattamuri *et al.*, 2013 Growth differentiation factor 9: bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: E776-E785.
- Persani, L., R. Rossetti and C. Cacciato, 2010 Genes involved in human premature ovarian failure. *Journal of molecular endocrinology* 45: 257-279.
- Porter, S., I. Clark, L. Kevorkian and D. Edwards, 2005 The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem. J* 386: 15-27.
- Powell, C. M., R. T. Taggart, T. C. Drumheller, D. Wangsa, C. Qian *et al.*, 1994 Molecular and cytogenetic studies of an X; autosome translocation in a patient with premature ovarian failure and review of the literature. *American journal of medical genetics* 52: 19-26.

- Pratta, M. A., W. Yao, C. Decicco, M. D. Tortorella, R.-Q. Liu *et al.*, 2003 Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. *Journal of Biological Chemistry* 278: 45539-45545.
- Primakoff, P., and D. G. Myles, 2000 The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends in Genetics* 16: 83-87.
- Primakoff, P., and D. G. Myles, 2002 Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science* 296: 2183-2185.
- Prober, J. M., G. L. Trainor, R. J. Dam, F. W. Hobbs, C. W. Robertson *et al.*, 1987 A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238: 336-341.
- Pyun, J.-A., S. Kim, D. Cha and K. Kwack, 2013 Epistasis between IGF2R and ADAMTS19 polymorphisms associates with premature ovarian failure. *Human Reproduction* 28: 3146-3154.
- Pyun, J.-A., S. Kim and K. Kwack, 2015 Epistasis between polymorphisms in ACVR2B and ADAMTS19 is associated with premature ovarian failure. *Menopause* 22: 212-216.
- Qin, Y., Y. Choi, H. Zhao, J. L. Simpson, Z.-J. Chen *et al.*, 2007 NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. *The American Journal of Human Genetics* 81: 576-581.
- Rain, J.-C., L. Selig, H. De Reuse, V. Battaglia, C. Reverdy *et al.*, 2001 The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* 409: 211-215.
- Rajkovic, A., S. A. Pangas, D. Ballow, N. Suzumori and M. M. Matzuk, 2004 NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 305: 1157-1159.
- Ramensky, V., P. Bork and S. Sunyaev, 2002 Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic acids research* 30: 3894-3900.
- Rannikko, A., P. Pakarinen, P. R. Manna, I. Beau, M. Misrahi *et al.*, 2002 Functional characterization of the human FSH receptor with an inactivating Ala189Val mutation. *Molecular human reproduction* 8: 311-317.
- Rao, E., B. Weiss, M. Fukami, A. Rump, B. Niesler *et al.*, 1997 Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nature genetics* 16: 54-63.
- Rebar, R. W., 2009 Premature ovarian failure. *Obstetrics & Gynecology* 113: 1355-1363.
- Rees, E., V. Moskvina, M. J. Owen, M. C. O'Donovan and G. Kirov, 2011 De novo rates and selection of schizophrenia-associated copy number variants. *Biological psychiatry* 70: 1109-1114.
- Reynaud, K., R. Cortvrindt, F. Verlinde, J. De Schepper, C. Bourgain *et al.*, 2004 Number of ovarian follicles in human fetuses with the 45, X karyotype. *Fertility and sterility* 81: 1112-1119.
- Richards, J. S., I. Hernandez-Gonzalez, I. Gonzalez-Robayna, E. Teuling, Y. Lo *et al.*, 2005 Regulated expression of ADAMTS family members in follicles and cumulus oocyte complexes: evidence for specific and redundant patterns during ovulation. *Biology of reproduction* 72: 1241-1255.
- Rife, M., C. Badenas, L. Quintó, E. Puigoriol, B. Tazon *et al.*, 2004 Analysis of CGG variation through 642 meioses in Fragile X families. *Molecular human reproduction* 10: 773-776.
- Robker, R., D. Russell, L. L. Espey, J. Lydon, B. O'Malley *et al.*, 2000 Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 4689-4694.
- Rodríguez-Manzaneque, J. C., A. B. Milchanowski, E. K. Dufour, R. Leduc and M. L. Iruela-Arispe, 2000 Characterization of METH-1/ADAMTS1 processing reveals two distinct active forms. *Journal of Biological Chemistry* 275: 33471-33479.

- Rodríguez Valbuena, H. J., 2014 Identificación de proteínas diferencialmente expresadas candidatas a controlar la histocompatibilidad en el hidrozooario *hydractinia symbiolongicarpus*, pp. Universidad Nacional de Colombia.
- Ronaghi, M., S. Karamohamed, B. Pettersson, M. Uhlén and P. Nyrén, 1996 Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical biochemistry* 242: 84-89.
- Ronaghi, M., M. Uhlén and P. Nyrén, 1998 A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281: 363-365.
- Rosario, R., H. Araki and A. N. Shelling, 2012 The transcriptional targets of mutant FOXL2 in granulosa cell tumours. *PloS one* 7: e46270.
- Rosewell, K. L., L. Al-Alem, F. Zakerkish, L. McCord, J. W. Akin *et al.*, 2015 Induction of proteinases in the human preovulatory follicle of the menstrual cycle by human chorionic gonadotropin. *Fertility and sterility* 103: 826-833.
- Rubio-Gozalbo, M., C. Gubbels, J. Bakker, P. Menheere, W. Wodzig *et al.*, 2010 Gonadal function in male and female patients with classic galactosemia. *Human Reproduction Update* 16: 177-188.
- Russell, D. L., H. M. Brown and K. R. Dunning, 2015 ADAMTS proteases in fertility. *Matrix Biology*.
- Sagane, K., K. Yamazaki, Y. Mizui and I. Tanaka, 1999 Cloning and chromosomal mapping of mouse ADAM11, ADAM22 and ADAM23. *Gene* 236: 79-86.
- Sanger, F., and A. R. Coulson, 1975 A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology* 94: 441-448.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson, 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74: 5463-5467.
- Santos, M. G., A. Z. Machado, C. N. Martins, S. Domenice, E. M. Costa *et al.*, 2014 Homozygous Inactivating Mutation in NANOS3 in Two Sisters with Primary Ovarian Insufficiency. *BioMed research international* 2014.
- Sato, K., K. Yomogida, T. Wada, T. Yorihozi, Y. Nishimune *et al.*, 2002 Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary. *Journal of Biological Chemistry* 277: 37678-37684.
- Schenborn, E., and W. Brondyk, 1998 The CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System. *Promega Notes*: 02.
- Schlessinger, D., L. Herrera, L. Crisponi, S. Mumm, A. Percesepe *et al.*, 2002 Genes and translocations involved in POF. *American journal of medical genetics* 111: 328-333.
- Schmidt, D., C. E. Ovitt, K. Anlag, S. Fehsenfeld, L. Gredsted *et al.*, 2004 The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 131: 933-942.
- Seals, D. F., and S. A. Courtneidge, 2003 The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes & development* 17: 7-30.
- Sharara, F. I., D. B. Seifer and J. A. Flaws, 1998 Environmental toxicants and female reproduction. *Fertility and sterility* 70: 613-622.
- Shelling, A. N., 2010 Premature ovarian failure. *Reproduction* 140: 633-641.
- Shendure, J., G. J. Porreca, N. B. Reppas, X. Lin, J. P. McCutcheon *et al.*, 2005 Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* 309: 1728-1732.
- Shimasaki, S., R. K. Moore, F. Otsuka and G. F. Erickson, 2004 The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Reviews* 25: 72-101.
- Silvera, L., and C. Barrios, 2012 La matriz extracelular: el ecosistema de la célula. *Revista Científica Salud Uninorte* 16.

- Smiley, A. K., J. M. Klingenberg, B. J. Aronow, S. T. Boyce, W. Kitzmiller *et al.*, 2005 Microarray analysis of gene expression in cultured skin substitutes compared with native human skin. *Journal of investigative dermatology* 125: 1286-1301.
- Smith, L. M., J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd *et al.*, 1986 DNA sequence analysis. *Nature* 321: 12.
- Soejima, K., M. Matsumoto, K. Kokame, H. Yagi, H. Ishizashi *et al.*, 2003 ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *Blood* 102: 3232-3237.
- Soejima, K., N. Mimura, M. Hiroshima, H. Maeda, T. Hamamoto *et al.*, 2001 A Novel Human Metalloprotease Synthesized in the Liver and Secreted into the Blood: Possibly, the von Willebrand Factor—Cleaving Protease? *Journal of biochemistry* 130: 475-480.
- Soyal, S. M., A. Amleh and J. Dean, 2000 FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development* 127: 4645-4654.
- Spicer, L., and P. Aad, 2007 Insulin-like growth factor (IGF) 2 stimulates steroidogenesis and mitosis of bovine granulosa cells through the IGF1 receptor: role of follicle-stimulating hormone and IGF2 receptor. *Biology of reproduction* 77: 18-27.
- Sybert, V. P., and E. McCauley, 2004 Turner's syndrome. *New England Journal of Medicine* 351: 1227-1238.
- Tassone, F., R. J. Hagerman, A. K. Taylor, L. W. Gane, T. E. Godfrey *et al.*, 2000 Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 66: 6-15.
- Terradot, L., N. Durnell, M. Li, M. Li, J. Ory *et al.*, 2004 Biochemical Characterization of Protein Complexes from the Helicobacter pylori Protein Interaction Map Strategies for Complex Formation and Evidence for Novel Interactions Within Type IV Secretion Systems. *Molecular & Cellular Proteomics* 3: 809-819.
- Tharapel, A., K. Anderson, J. Simpson, P. Martens, R. S. Wilroy Jr *et al.*, 1993 Deletion (X)(q26. 1--> q28) in a proband and her mother: molecular characterization and phenotypic-karyotypic deductions. *American journal of human genetics* 52: 463.
- Therman, E., R. Laxova and B. Susman, 1990 The critical region on the human Xq. *Human genetics* 85: 455-461.
- Toonen, R. J., and S. Hughes, 2001 Increased throughput for fragment analysis on an ABI Prism® 377 automated sequencer using a membrane comb and STRand software. *Biotechniques* 31: 1320-1325.
- Tortorella, M., A.-M. Malfait, C. Deccico and E. Arner, 2001 The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthritis and Cartilage* 9: 539-552.
- Tortorella, M. D., F. Malfait, R. A. Barve, H.-S. Shieh and A.-M. Malfait, 2009 A review of the ADAMTS family, pharmaceutical targets of the future. *Current pharmaceutical design* 15: 2359-2374.
- Treier, M., A. S. Gleiberman, S. M. O'Connell, D. P. Szeto, J. A. McMahon *et al.*, 1998 Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes & development* 12: 1691-1704.
- Tsuda, M., Y. Sasaoka, M. Kiso, K. Abe, S. Haraguchi *et al.*, 2003 Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science* 301: 1239-1241.
- Tuteja, G., and K. H. Kaestner, 2007 SnapShot: forkhead transcription factors I. *Cell* 130: 1160. e1161-1160. e1162.

- Uda, M., C. Ottolenghi, L. Crisponi, J. E. Garcia, M. Deiana *et al.*, 2004 Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Human molecular genetics* 13: 1171-1181.
- Valouev, A., J. Ichikawa, T. Tonthat, J. Stuart, S. Ranade *et al.*, 2008 A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Genome research* 18: 1051-1063.
- Vázquez, F., G. Hastings, M.-A. Ortega, T. F. Lane, S. Oikemus *et al.*, 1999 METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *Journal of Biological Chemistry* 274: 23349-23357.
- Von der Mark, K., 1999 *Structure, biosynthesis and gene regulation of collagens in cartilage and bone*. Academic Press, Orlando.
- Von Kaisenberg, C., B. Brand-Saberi, B. Christ, S. Vallian, F. Farzaneh *et al.*, 1998 Collagen type VI gene expression in the skin of trisomy 21 fetuses. *Obstetrics & Gynecology* 91: 319-323.
- Vujovic, S., 2009 Aetiology of premature ovarian failure. *Menopause international* 15: 72-75.
- Waggoner, D., N. Buist and G. Donnell, 1990 Long-term prognosis in galactosaemia: results of a survey of 350 cases. *Journal of inherited metabolic disease* 13: 802-818.
- Watts, D., and J. R. MacBeath, 2001 Automated fluorescent DNA sequencing on the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, pp. 153-170 in *DNA Sequencing Protocols*. Springer.
- Weil, D., M. Mattei, E. Passage, V. N'Guyen, D. Pribula-Conway *et al.*, 1988 Cloning and chromosomal localization of human genes encoding the three chains of type VI collagen. *American journal of human genetics* 42: 435.
- Weinstein, L. S., J. Liu, A. Sakamoto, T. Xie and M. Chen, 2004 Minireview: GNAS: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 145: 5459-5464.
- Wheatcroft, N., C. Salt, A. Milford-Ward, I. Cooke and A. Weetman, 1997 Identification of ovarian antibodies by immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay or immunoblotting in premature ovarian failure. *Human reproduction* 12: 2617-2622.
- White, J. M., 2003 ADAMs: modulators of cell–cell and cell–matrix interactions. *Current opinion in cell biology* 15: 598-606.
- Wittenberger, M. D., R. J. Hagerman, S. L. Sherman, A. McConkie-Rosell, C. K. Welt *et al.*, 2007 The FMR1 premutation and reproduction. *Fertility and sterility* 87: 456-465.
- Wu, X., B. Wang, Z. Dong, S. Zhou, Z. Liu *et al.*, 2013 A NANOS3 mutation linked to protein degradation causes premature ovarian insufficiency. *Cell death & disease* 4: e825.
- Yan, C., P. Wang, J. DeMayo, F. J. DeMayo, J. A. Elvin *et al.*, 2001 Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular Endocrinology* 15: 854-866.
- Zhao, H., Z.-J. Chen, Y. Qin, Y. Shi, S. Wang *et al.*, 2008a Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. *The American Journal of Human Genetics* 82: 1342-1348.
- Zhao, Z. Z., J. N. Painter, J. S. Palmer, P. M. Webb, N. K. Hayward *et al.*, 2008b Variation in bone morphogenetic protein 15 is not associated with spontaneous human dizygotic twinning. *Human reproduction* 23: 2372-2379.
- Zheng, X., K. Nishio, E. M. Majerus and J. E. Sadler, 2003 Cleavage of von Willebrand factor requires the spacer domain of the metalloprotease ADAMTS13. *Journal of Biological Chemistry* 278: 30136-30141.
- Zheng, Y., P. Saftig, D. Hartmann and C. Blobel, 2004 Evaluation of the contribution of different ADAMs to tumor necrosis factor α (TNF α) shedding and of the function of the TNF α ectodomain in ensuring selective stimulated shedding by the TNF α convertase (TACE/ADAM17). *Journal of Biological Chemistry* 279: 42898-42906.

- Zinn, A. R., and J. L. Ross, 1998 Turner syndrome and haploinsufficiency. *Current opinion in genetics & development* 8: 322-327.
- Zinn, A. R., V. S. Tonk, Z. Chen, W. L. Flejter, H. A. Gardner *et al.*, 1998 Evidence for a Turner syndrome locus or loci at Xp11. 2-p22. 1. *The American Journal of Human Genetics* 63: 1757-1766.